

UNTERSUCHUNGEN ZUR ÜBERTRAGBARKEIT
DES HAMSTERMELANOMS A Mel 3

Hermann Kimmerle

1975

AUS DER DERMATOLOGISCHEN KLINIK
DER UNIVERSITÄT MÜNCHEN

Direktor: Prof. Dr. O. BRAUN-FALCO

UNTERSUCHUNGEN ZUR ÜBERTRAGBARKEIT
DES HAMSTERMELANOMS A Mel 3

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde in der Zahnheilkunde
verfaßt und
einer Hohen Medizinischen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität zu München



vorgelegt von

Hermann Kimmerle
aus Lauingen (Donau)

München 1975

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Referent:	Priv.-Doz. Dr. B. -R. BALDA
Korreferent:	Prof. Dr. O. BRAUN-FALCO
Dekan:	Prof. Dr. W. SPANN

Tag der mündlichen Prüfung: 31. 7. 1975



INHALT

1.1.	VORWORT	1
1.2.	Einleitung	2
1.3.	Die ersten Schritte	3
1.4.	Die ersten Schritte	4
1.5.	Die ersten Schritte	5
1.6.	Die ersten Schritte	6
1.7.	Die ersten Schritte	7
1.8.	Die ersten Schritte	8
1.9.	Die ersten Schritte	9
1.10.	Die ersten Schritte	10

MEINEN LIEBEN ELTERN

2.1.	GEWIDMET	11
2.2.	Die ersten Schritte	12
2.3.	Die ersten Schritte	13
2.4.	Die ersten Schritte	14

3.1.	GEWIDMET	15
3.2.	Die ersten Schritte	16
3.3.	Die ersten Schritte	17
3.4.	Die ersten Schritte	18
3.5.	Die ersten Schritte	19

4.1.	GEWIDMET	20
4.2.	Die ersten Schritte	21
4.3.	Die ersten Schritte	22
4.4.	Die ersten Schritte	23



Digitized by the Internet Archive
in 2026

I N H A L T

1.0.	EINLEITUNG	7
1.1.	Das maligne Melanom	7
1.2.	Transplantable Tumoren	8
1.3.	Transplantable Melanome	8
2.0.	MELANOME DES GOLDHAMSTERS	9
2.1.	Transplantable Melanome des Goldhamsters	9
2.2.	Das amelanotische Melanom A Mel 3	10
3.0.	PROBLEMSTELLUNG	12
3.1.	Übertragung von Tumorzellen	14
3.2.	Die Wirkung von Proflavin	15
3.3.	Zellfreie Übertragung	17
4.0.	MATERIAL UND METHODEN	20
4.1.	Tumor	20
4.2.	Versuchstiere	20
4.3.	Tumorübertragung	21
4.4.	Proflavingabe	25
4.5.	Übertragung von Zellbestandteilen	26
5.0.	ERGEBNISSE	31
5.1.	Übertragung von Tumorzellen	31
5.2.	Ergebnisse der Zellübertragung bei gleichzeitiger Proflavingabe	46
5.3.	Ergebnisse der zellfreien Übertragung	48

6.0.	DISKUSSION	61
6.1.	Beschaffenheit des Tumors	61
6.2.	Überlebenszeit	62
6.3.	Angehrate und Letaldosis	65
6.4.	Proflavingabe	68
6.5.	Zellfreie Übertragung	69
7.0.	ZUSAMMENFASSUNG	77
8.0.	LITERATUR	79

1.0. E I N L E I T U N G

1.1. DAS MALIGNE MELANOM

Im Vergleich zu anderen Tumoren erscheint das maligne Melanom als die bösartigste Neoplasie des Menschen (40, 84). Seine sowohl hämatogene als auch lymphogene Metastasierung, sein schlechtes Ansprechen auf die verschiedenen Behandlungsmethoden und eine hohe Sterblichkeitsrate der Erkrankten (17, 30, 36, 42, 47, 57) erklären in etwa die Gefährlichkeit dieser Geschwulst.

Es verwundert deshalb nicht, daß in aller Welt große Anstrengungen zu einem besseren Verständnis dieses Tumors unternommen werden, um bessere Einblicke in die Histopathogenese und möglicherweise auch in die Ätiologie des Melanoms zu gewinnen. Als besonders lehrreich haben sich hierbei Untersuchungen an tierischen Modelltumoren erwiesen.

1.2. TRANSPLANTABLE TUMOREN

Transplantationsversuche mit Tierkarzinomen sind schon aus den letzten Jahrzehnten des 19. Jahrhunderts bekannt (72).

Mit der Ausweitung der tierexperimentellen Tumorforschung gelang es, für fast alle menschlichen Krebsarten entsprechende transplantierbare Modelltumoren zu finden (64).

1.3. DAS TIEREXPERIMENTELLE MELANOM

Über ein übertragbares Melanom der Maus berichteten erstmalig 1930 HARDING und PASSEY (35). Inzwischen finden sich Mitteilungen über etwa zwanzig verschiedene spontane Tiermelanome, so z. B. bei Fischen, Rindern, Hühnern, Schweinen, Hunden etc. (52, 81). Wegen der guten Handhabbarkeit, insbesondere der Übertragbarkeit, spielen jedoch in der Forschung vor allem die Melanome der Maus und des Goldhamsters eine wichtige Rolle (53).

2.0. M E L A N O M E D E S G O L D H A M S T E R S

Als eines der zweckmäßigsten Versuchstiere hat sich der Goldhamster (*Mesocricetus auratus*) erwiesen. Als relativ anspruchsloses Tier ist er vergleichsweise billig, in Zucht, Haltung und Pflege stellt er keine großen Anforderungen. Die Möglichkeit standardisierter Bedingungen und das Vorhandensein von Inzuchtstämmen haben dies noch mitbegründet.

2.1. TRANSPLANTABLE MELANOME DES GOLDHAMSTERS

Die Anzahl der beim Goldhamster untersuchten und nachgewiesenen Melanome ist inzwischen deutlich größer als bei der Maus (52). Neben spontan auftretenden Tumoren, wie sie unter anderem von BOMIRSKI, FORTNER, GREENE, RIVIERE und SCHROEDER (15, 25, 26, 33, 59, 64) beschrieben wurden, ist auch eine Anzahl von Hamstermelanomen bekannt, die sich auf chemischem Wege oder auch durch Viren induzieren ließen (20, 46, 55, 63, 67).

Mit dieser Vielfalt an Varianten ist es heute möglich, das weite Spektrum der menschlichen Melanome auch in tierexperimentellen Untersuchungen umfassend nachzuahmen (1). Schon FORTNER (26) selbst sieht in dem von ihm beschriebenen malignen Melanom des Goldhamsters "an experimen-

tal counterpart of the human malignant melanoma". OTT (54) spricht von einem "Spiegelbild" der menschlichen Melanome, und die vergleichenden Untersuchungen zwischen menschlichem Melanom und den Melanomen des Goldhamsters zeigen (4, 27, 80), daß man mit diesen Tumoren, speziell auch mit dem Melanom A Mel 3 (s. 2.2.) sehr wohl ein "mögliches Modell für das menschliche maligne Melanom", wie es BALDA formulierte, gefunden haben könnte.

In der vorliegenden Arbeit haben wir uns mit mehreren Fragen anhand von Versuchsreihen mit eben diesem amelanotischen Melanom beschäftigt, denn dieser Tumor besitzt einige Eigenschaften, die ihn für unsere Experimente sehr geeignet erscheinen ließen: Er ist einfach und sicher zu transplantieren und zeigt aufgrund seines raschen Wachstums und seiner Metastasierungseigenschaften, ebenso wie in seinem histologischen Bild und seinen Ultrastrukturen, Ähnlichkeiten mit dem menschlichen Melanom. Weiterhin ist vorteilhaft, daß durch das Fehlen von Pigment Präparationen und Messungen kaum störend beeinflußt werden (1).

2.2. DAS AMELANOTISCHE MELANOM A Mel 3 DES GOLDHAMSTERS

Im Jahre 1957 berichtete FORTNER (25) von spontan auftretenden Tumoren des Goldhamsters. Ein Jahr später wurde sein Bericht durch eine Arbeit ergänzt (26), in der diese Un-

tersuchungen fortgeführt und insgesamt zehn solcher Tumoren vorgestellt wurden. Es gelang schließlich, fünf dieser Melanome in eine transplantable Form zu bringen und auf weitere Versuchstiere zu übertragen. Die histologischen Analysen zeigten, daß es sich um teils melanotisch, teils amelanotisch wachsende Melanome handelte.

Für unsere Untersuchungen verwendeten wir das später als A Mel 3 (28) bezeichnete, amelanotische Melanom. Dieser Tumor läßt sich durch relativ einfache Techniken (als Zellsuspension oder als Transplantat) auf andere Tiere übertragen. Seine Angehrate liegt bei 100 % (28, 52, 60). Er wächst rasch in 7-21 Tagen zu einem nahezu soliden Tumor heran und erreicht einen Durchmesser von etwa 25 mm (68). Makroskopisch ist er derb-höckrig, im Zentrum imponiert bei größeren Exemplaren ein schwärzlicher, nekrotischer Bezirk (60).

Genau wie sein menschliches Pendant metastasiert dieser Tumor sehr rasch, bevorzugt in Lymphknoten, Herz, Niere, Leber und Lunge (28, 56, 60). Mikroskopisch sind Zell- und Kernpolymorphie wesentlich. Auffallend sind der große Reichtum an Mitochondrien und Ribosomen, sowie große Nucleolen und Kernporen (79).

3.0. P R O B L E M S T E L L U N G

Zwar liegen eine Reihe von Berichten über die Übertragbarkeit von Melanomen vor (28, 52, 66), doch interessierten uns weitere Details, so, ob

- a) die Anzahl der übertragenen Zellen einen Einfluß auf die Beschaffenheit des Tumors hat,
- b) ein Zusammenhang zwischen übertragener Zellzahl und Überlebenszeit der erkrankten Tiere besteht, und
- c) wo gegebenenfalls ein Grenzbereich liegt, unterhalb dessen eine Transplantation des Tumors nicht mehr mit Sicherheit möglich ist.

Im weiteren Verlauf der Experimente widmeten wir uns dem Einfluß von Modellpharmaka auf das Tumorwachstum.

Wir verwendeten dazu Proflavin, das als mutagene Substanz bekannt ist und das als Hemmstoff der DNS-abhängigen DNS- und RNS-Synthese (37, 43, 44) gilt, speziell wenn es sich um die zirkuläre DNS handelt. Außerdem lagen Berichte über tierexperimentelle Untersuchungen vor, die einen Hemmefekt auf die DNS-Synthese durch eine Interkalation des Proflavins in DNS beschrieben.

Der Verdacht, daß die Tumorübertragung an bestimmte Zellstrukturen gebunden sein könnte, war Ausgangspunkt unserer Überlegungen. Vor allem deshalb, da von BALDA et al. (6) im Hamstermelanom A Mel 3 partikelassoziierte RNS-gesteuerte DNS-Polymerase (umgekehrte Transkriptase) gleichzeitig mit einer hochmolekularen einsträngigen RNS nachgewiesen werden konnte.

Da von Proflavin bekannt ist, daß es sich an Nucleinsäuren bindet - nach der Vorstellung von LERMANN (44) lagert sich das Acridinmolekül wie ein "sandwich" zwischen zwei benachbarte Ebenen von DNS-Basenpaaren ein - und imstande ist, die Synthese gewisser Proteine zu hemmen (2, 5, 7), hielten wir es für möglich, daß die Gabe von Proflavin einen Einfluß auf Tumorübertragung bzw. Tumorwachstum haben könnte. Zu diesem Zwecke wurde ein Teil der Versuchstiere mit Proflavin behandelt und wir beobachteten Erkrankungsbeginn und Überlebenszeit bei Goldhamstern mit und ohne Pharmakagaben.

Schließlich wollten wir sehen, ob die Möglichkeit besteht, diesen von uns untersuchten Tumor zellfrei zu übertragen. Aus diesem Grunde untersuchten wir, ob einzelne subzelluläre Strukturen, nämlich

Zellkerne,

Mitochondrien und Mikrosomen

isoliert in der Lage sind, Melanome hervorzurufen. Vor allem mit Hilfe der Mikrosomen sollte dies möglich sein, da von BALDA et al. und BIRKMAYER et al. (3, 4, 6, 10) in der Mikrosomenfraktion sowohl elektronenmikroskopisch als auch biochemisch Viruspartikel nachgewiesen worden waren, deren biologische Wertigkeit es zu überprüfen galt.

3.1. ÜBERTRAGUNG VON TUMORZELLEN

Während in den ersten Jahren der tierexperimentellen Tumorübertragung noch Geschwülste mittels ganzer Gewebestücke übertragen wurden, indem man diese mit Hilfe eines Troicart den Versuchstieren inoculierte (65, 68), erkannte man doch bald, daß die Übertragung mittels eines Tumorbreies oder einzelner aufbereiteter Tumorzellen erfolgversprechender ist. Vor allem für quantitatives Arbeiten ist ein Vorgehen mit exakten Mengenangaben unerlässlich.

Da für das Hamstermelanom A Mel 3 gezielte Untersuchungen zu seiner Übertragbarkeit noch ausstanden, untersuchten wir diesbezügliche Einzelheiten. Uns interessierte insbesondere ein Zusammenhang zwischen den übertragenen Zellzahlen und den Auswirkungen auf Tier und Tumor. Zu diesem Zweck mußten wir die Geschwülste zuerst in eine übertragbare Form bringen und eine Methode finden, die dabei übertragenen Zellen zu ermitteln.

Unsere Kriterien waren die Beschaffenheit der wachsenden Tumoren und eine eventuelle Abhängigkeit von der Zellzahl, die diese Melanome erzeugt hatte, sowie das Wachstum der Neubildungen und die Überlebensdauer der Versuchstiere.

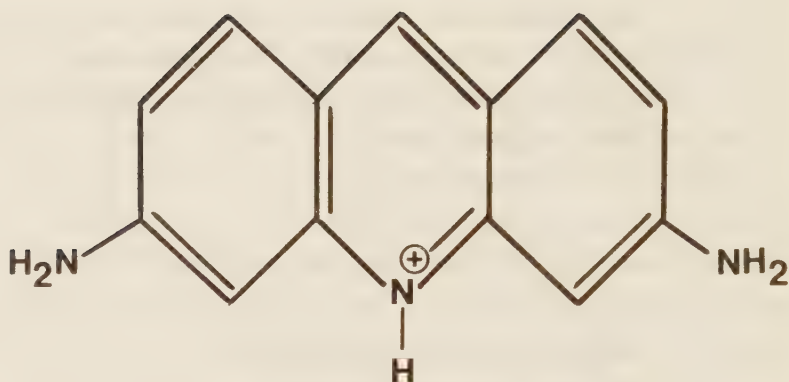
Auch hier galt es einen Einfluß der übertragenen Zellzahlen zu ergründen und die Ergebnisse mit schon vorhandenen Erkenntnissen (53, 68) zu vergleichen, sowie eine Ausgangsbasis für unsere Versuche mit Proflavin zu schaffen. Vor allem aber, und das insbesondere im Hinblick auf eine zell-

freie Übertragung, interessierte uns, ob es eine Schwelle, einen Grenzbereich gibt, bis zu welchem eine Tumorübertragung erfolgreich verläuft, und unterhalb dessen eine Transplantation nicht mehr oder nicht mehr in jedem Falle zu einem Ergebnis führt.

3.2. DIE WIRKUNG VON PROFLAVIN AUF DAS TUMORWACHSTUM

Schon seit langem sind in der Humanmedizin Farbstoffe therapeutisch angewandt worden. Paul EHRLICH war der erste, der mit Farbstoffen experimentierte. Er beschäftigte sich mit Methylenblau und mit dem Azo-Farbstoff Trypanrot und erzielte damit auch günstige Ergebnisse bei der Bekämpfung von Trypanosomen (21, 22, 34). Vor allem aber die Acridin-farbstoffe wurden in der vorantibiotischen Ära als antibakteriell wirksame Substanzen mit Erfolg bei der Behandlung von Infektionskrankheiten eingesetzt (13, 14).

Acridin-farbstoffe erweckten in jüngster Zeit wieder das Interesse der Biochemiker und Pharmakologen, da diese Substanzen als Hemmstoffe der Protein- und DNS- und RNS-Synthese bei Mikroorganismen erkannt wurden (18, 24, 37, 43, 44, 76). Von NEUBERT (49) wurde eine Beeinflussung des Nucleinsäurestoffwechsels von Warmblütler-Mitochondrien in vitro durch diese Farbstoffe nachgewiesen und VAN DUUREN (75) fand, daß durch Acridinorange eine Inhibierung der Carcinogenese in der Mäusehaut möglich ist.



PROFLAVIN

Formel von Proflavin

BALDA und BIRKMAYER untersuchten den Einfluß von Proflavin auf den DNS-Stoffwechsel des Hamstermelanoms A Mel 3, wobei sie unter anderem mittels ^3H -Thyminmarkierter DNS eine DNS-Synthesehemmung in Tumormitochondrien nachweisen konnten (1, 2, 7, 9).

Für uns stellte sich nun die Frage, ob sich eine solche in vitro erreichte Synthesehemmung bestimmter Tumorproteine auch in vivo nachweisen läßt, ob also Proflavingaben das Wachstum dieser Hamsterneoplasmen in irgend einer Weise beeinflussen können.

Zu diesem Zweck untersuchten wir bei Goldhamstern Krank-

heitsbeginn und Überlebenszeit nach der Übertragung von Tumorzellen, während die Tiere mit diesem Farbstoff behandelt wurden.

3.3. ZELLFREIE TUMORÜBERTRAGUNG

Seit es ROUS 1910 zum ersten Mal gelungen war, ein spontan entstandenes Hühnersarkom zellfrei zu übertragen (61), konnten bei einer Vielzahl von Tiertumoren Viren als auslösendes Agens verifiziert werden (31, 58, 70, 83). Auch beim Hamstermelanom A Mel 3 wurden durch BALDA et al. (3) und WOLFF et al. (79) elektronenmikroskopische Viruspartikelchen nachgewiesen, die morphologisch denen in anderen Tumoren ähnlich sind (23, 38).

Von einer zellfreien Übertragung dieses Hamstermelanoms lagen noch keine Berichte vor, als wir uns mit diesen Versuchen beschäftigten. Für uns erhob sich deshalb die Frage, ob sich dieses Melanom überhaupt zellfrei transplantieren läßt, und ob den virusähnlichen Partikelchen eine biologische Wertigkeit zukommt.

Abbildung 1 zeigt einen Ausschnitt aus einer Tumorzelle des Hamstermelanoms A Mel 3 am 10. Tag nach der Übertragung in einer elektronenmikroskopischen Aufnahme. Die Vergrößerung beträgt 1 : 28 000.

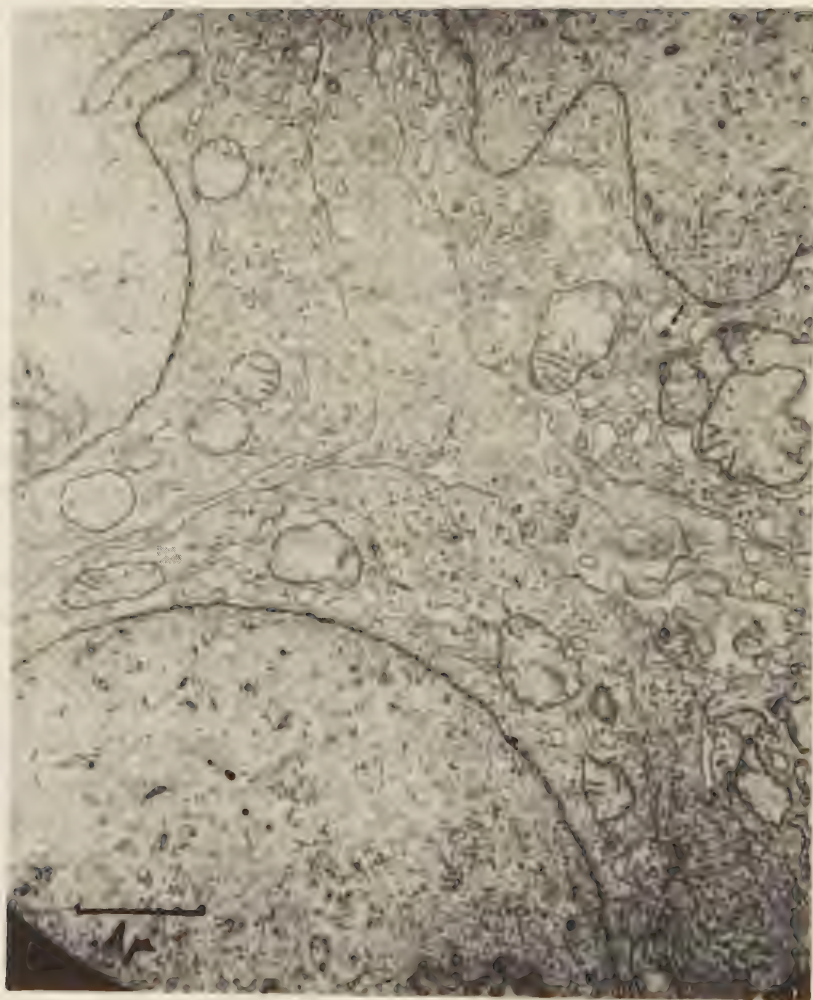


ABBILDUNG 1

Elektroenmikroskopisches Bild eines Hamstermelanoms, ca. 10 Tage nach der Überimpfung.

Vergrößerung: 18 700 x

Aufnahme: G. D. Birkmayer

Ganz deutlich läßt sich links unten der Kern, der zu etwa einem Viertel angeschnitten ist, erkennen. Die mehr oder weniger kreisförmigen Organellen im Zellplasma sind die Mitochondrien mit ihren typischen Cristae und ein auffallender Reichtum an Ribosomen bzw. Polysomen tritt deutlich in Erscheinung.

Eingestreut zwischen den Zellorganellen sind einige, etwa stecknadelgroße, zum Teil mit einer Art "Wagenradstruktur" versehene Gebilde erkennbar (siehe Pfeil). Es handelt sich hier um virusähnliche Partikelchen.

4.0. M A T E R I A L U N D M E T H O D E N

4.1. TUMOR

Als Ausgangsmaterial wurden uns freundlicherweise von Herrn Priv.-Doz. Dr. D. Gericke, Farbwerke Hoechst AG, Frankfurt a. Main, einige tumortragende Tiere mit dem Melanom A Mel 3 zur Verfügung gestellt. Dieser Tumor wurde während der gesamten Dauer der Versuche von uns über etwa 35 Passagen weitergeführt.

4.2. VERSUCHSTIERE

Als Versuchstiere verwendeten wir anfänglich 100-120 g schwere, dann 80-100 g schwere weibliche, Syrische Goldhamster (*Mesocricetus auratus*) aus der Versuchstierzuchtanstalt Bäumler in Wolfratshausen. Die Tiere waren im allgemeinen etwa 4-6 Monate alt.

4.2.1. Tierhaltung

In der Regel hielten wir die Tiere zu zweit in stapelbaren, nummerierten Käfigen. Sie befanden sich in einem temperierten Raum von ca. 22°C.

Als Nahrung erhielten die Tiere ein Fertigfutter (Altrumin H) und Wasser ad libidum.

4.3. TUMORÜBERTRAGUNG

Für die Tumorpassage sowie für die beiden ersten Abschnitte unserer Versuche benötigten wir jeweils eine gewisse Anzahl von Tumorzellen. Zur Gewinnung des für die Übertragung notwendigen Materials wandten wir die im folgenden beschriebene Arbeitsweise an (2).

4.3.1. Tumorgewinnung

Die erkrankten Tiere wurden ca. 10-14 Tage nach der Tumorübertragung, sobald die Tumoren etwa die Größe einer Mandel erreicht hatten, dekapitiert. Die Geschwülste wurden nun sorgfältig in toto und unter sterilen Bedingungen herauspräpariert und in einem eisgekühlten Dewargefäß gesammelt. Meist standen uns 4-6 Tumoren für eine Versuchsgruppe zur Verfügung.

4.3.2. Zellpräparation

Zur weiteren Verarbeitung gelangten nun die intakten Randbezirke der Melanome, die zentralnekrotischen Gebiete wur-

den nicht verwendet. Das Gewebe wurde in physiologischer Kochsalzlösung mit einer Schere fein zerkleinert und anschließend in einem selbstgefertigten Plexiglas-Homogenisator (nach Potter-Elvehjem) mit locker reibendem Pistill weiter zerrieben, bis eine gleichmäßige Färbung der Suspension eintrat. Nun wurde das Gemisch durch eine vierfache Mullschicht abgossen, um Bindegewebsbestandteile und größere, nicht homogenisierte Gewebstückchen zurückzuhalten, und anschließend etwa 5 Minuten bei 700 g in der Sorvall-RC 2-B Kühlzentrifuge aus zentrifugiert. Das Sediment wurde erneut in physiologischer Kochsalzlösung aufgenommen.

4.3.3. Auszählen der Tumorzellen

Anschließend erfolgte unter dem Mikroskop eine Zellzählung, einmal, um die Vitalität der Zellen zu überprüfen, zum anderen, um exakte Verdünnungsreihen herstellen zu können. Hierfür verwendeten wir eine Zählkammer nach Neubauer, wie sie auch zum Auszählen von Blutzellen hergenommen wird. Zur besseren Sichtbarmachung wurden die Zellen mit Trypanblau im Verhältnis 1 : 1 angefärbt. Durch Auszählen der Zellen in der Zählkammer und durch anschließendes Verdünnen der Stammlösung erhielten wir die für die Übertragung vorgesehenen Zellzahlen. Der Prozentsatz der vitalen Zellen lag bei 70 - 80 %.

4.3.4. Übertragung des Tumormaterials

Die Zellsuspensionen wurden in Einmalspritzen aufgenommen und an die Versuchstiere entweder subcutan im Rückenbereich, oder intraperitoneal, verimpft. Nach Möglichkeit wurde die Verdünnung so gewählt, daß sich die für die Übertragung vorgesehene Anzahl von Zellen in 0,5 ml oder in 1 ml des Mediums befanden. Zur Kontrolle wurden auch, vor allem bei der Übertragung der geringen Zellzahlen, immer wieder die Verdünnungsreihen nachgeprüft.

Bei der Übertragung mußten die Tiere von einem Helfer gehalten werden. Zur subcutanen Übertragung wurde die Nadel im Rückenbereich etwas seitlich der Wirbelsäule eingeführt und unter vorsichtigem Tasten etwa 1 bis 1,5 cm weit unter der Haut cranialwärts vorgeschoben. Dort wurde dann das Depot gesetzt. Das war notwendig, um einen Materialverlust durch die Einstichöffnung zu vermeiden.

Wurden die Tumorzellen intraperitoneal eingeführt, so mußten die Tiere dazu auf dem Rücken liegend gehalten werden. Während mit der einen Hand ein Hinterbein gestreckt wurde, konnte man mit der anderen die Kanüle in der Leistenbeuge einstechen und die Tumorzellen in den Bauchraum applizieren.

Bei der Tumorübertragung begannen wir mit einer relativ hohen Anzahl von Zellen im Größenbereich von mehreren Millionen, wie sie in vorbereitenden Versuchen ermittelt wurden. Einen Anhaltspunkt dafür lieferten uns die Werte, die von OTT und STORCK (49) bei der Transplantation einer

Ascitesform eines Hamstermalanoms beschrieben wurden. Im weiteren Verlauf der Untersuchungen senkten wir die Anzahl der übertragenen Zellen kontinuierlich, bis wir in einen Bereich kamen, bei dem nicht mehr jede Übertragung zu einem Erfolg führte. Die niedrigsten Zellzahlen, die wir übertrugen, waren 100 Zellen pro Tier.

Es wurden immer mehrere Tiere gleichzeitig, meist 4-6, mit Tumormaterial beimpft. Die an einem Tag infizierten Hamster faßten wir in Gruppen zusammen, da die Zellzahlen bei ihnen korrespondierten.

Um ein Absterben der Zellen während des Präparationsvorganges zu verhindern, sollte er in möglichst kurzer Zeit vollendet sein. Außerdem wurden alle Arbeitsgänge in einer Kühlinsel bei etwa 4°C und mit vorgekühlten Instrumenten vorgenommen. In der Regel dauerte der Vorgang von der Entnahme des Tumors bis zur Übertragung des Zellmaterials auf die Versuchstiere 40-50 Minuten.

Die Versuchstiere wurden anfangs täglich, später in Abständen von 2-3 Tagen, untersucht, die Ergebnisse in Tabellen festgehalten. Als Erkrankungs-tag zählte der Tag, an dem zum ersten Mal ein Tastbefund (kleine Knötchen im Rückenbereich) zu spüren war. Dies war meist ein bis zwei Tage vor einem sichtbaren Tumor der Fall.

4.4. PROFLAVINGABE

Im zweiten Abschnitt unserer Versuche behandelten wir einen Teil der Versuchstiere gleichzeitig, vom Tage der Übertragung der Krebszellen an, mit Proflavin. Das Proflavin stammte von der Fluka AG, Buchs/SG, Schweiz.

Nachdem sich bei Vorversuchen das Einspritzen des Proflavins bei den Versuchstieren als zu langwierig und zu kompliziert herausgestellt hatte, erschien es uns am einfachsten und zweckmäßigsten, das Mittel den Tieren im Trinkwasser aufgelöst zu verabfolgen.

Zu diesem Zwecke bestimmten wir die tägliche Trinkmenge. Sie betrug durchschnittlich 10 ml Wasser pro Hamster. Da wir pro Tier und pro Tag 1 mg Proflavin verabreichen wollten (das entspricht einer Tagesdosis von 10 mg/kg Körpergewicht), wurden je 20 mg Proflavin in den 200 ml fassenden Trinkflaschen aufgelöst. Zwei weitere Gruppen erhielten jeweils eine Tagesdosis von 24 mg/kg Körpergewicht. Der Trinkwasserverbrauch wurde gemessen, die Trinkgefäße zweimal pro Woche ausgewechselt. Die Tiere erhielten das Proflavin bis zu ihrem Tode.

4.5. ÜBERTRAGUNG VON ZELLBESTANDTEILEN

Im weiteren Ablauf unserer Arbeit wollten wir gezieltere Untersuchungen über die Möglichkeiten einer zellfreien Tumorübertragung vornehmen. Zu diesem Zwecke isolierten wir aus den Hamstermelanomen die folgenden Zellorganellen:

Zellkerne

Mitochondrien

Mikrosomen

und übertrugen sie auf gesunde Versuchstiere.

Zur Isolierung und Reinigung der Zellfraktionen wandten wir die von BALDA und BIRKMAYER (1) angegebene Methode an.

Dazu wurden die Tumoren, wie unter 4.3.1. beschrieben, gewonnen und vorbehandelt, die herausgeschnittenen und von Nekrosen befreiten Teile zerstückelt und anschließend 3-5 Minuten in einem Plexiglas-Homogenisator mit geringem Spiel in

0,32 M Tris-gepufferter (pH 7,4) Saccharose mit
0,5 mM EDTA homogenisiert.

Das Homogenat wurde nun durch eine doppelte Schicht Mull abgegossen.

4.5.1. Präparation der Zellkerne

Die Zellkerne gewannen wir, indem wir das Homogenat 10 Minuten lang bei 3000 UpM in der Kälzentrifuge (Sorvall RC 2-B) sedimentierten. Der Überstand I wurde vorsichtig

in ein Reagenzglas abgekippt und für die Weiterverwendung kühlgestellt, das Sediment in 0,32 M Tris-gepufferter Saccharose mit einem Zusatz von 3 mM $MgCl_2$ aufgeschwemmt und erneut 10 Minuten bei 25 000 UpM zentrifugiert. Dieses Waschen vollzogen wir noch zweimal. Danach wurde 2,2 M Saccharose dazugegeben und das ganze 60 Minuten bei 27 000 UpM in der Ultrazentrifuge (Spinco L 2-50 B) auszen-
trifugiert.

4.5.2. Präparation der Mitochondrien

Der Überstand I wurde noch einmal bei 3000 UpM, dann 10 Minuten lang bei 12 500 UpM zentrifugiert. Das Sediment wurde erneut in 0,32 M Saccharose mit 0,5 mM EDTA aufgeschwemmt und bei 12 500 UpM zentrifugiert. Dieser Überstand (Überstand II) wurde für die Mikrosomenpräparation weiterverwendet. Pro ml des Niederschlags fügten wir jetzt 2,25 ml einer 2,4 M Saccharose mit 0,5 mM EDTA hinzu, vermischten beides in einem Zellulose-Reagenzglas und überschichteten es vorsichtig mit 0,32 M Saccharose mit 0,5 mM EDTA. Dieses Reagenzglas wurde in einem Schwingbecherrotor bei 200 000 . g 90 Minuten zentrifugiert.

An der Schichtgrenze erhielten wir eine Ansammlung von Mitochondrien, die mittels einer Einmalspritze abgesaugt und durch zehnminütiges Zentrifugieren mit physiologischer Kochsalzlösung von Saccharose freigewaschen wurden.

4.5.3. Präparation der Mikrosomen

Zur Gewinnung der Mikrosomen wurde der Überstand II der Mitochondrien-Zentrifugation hergenommen. Dieser Überstand wurde in der Spinco-Zentrifuge eine Stunde lang mit dem Rotor SW 40 bei 40 000 UpM auszentrifugiert. Das Sediment, das die Mikrosomen enthielt, wurde für unsere Übertragungen hergenommen. Alle diese Präparationsschritte wurden bei ca. 4°C vorgenommen.

4.5.4. Übertragung

Von dem so erhaltenen Material wurde jeweils ein Teil in Mikrospritzen aufgenommen und in Portionen von 0,5 - 1,0 ml auf die Versuchstiere übertragen.

Das Material wurde den Goldhamstern wiederum entweder subcutan oder intraperitoneal, wie bereits beschrieben, verabreicht.

Mit einem weiteren Teil führten wir Proteinbestimmungen durch.

4.5.5. Überprüfung der Einzelfractionen

Die einzelnen, zur Übertragung vorgesehenen Fractionen der Zellkerne überprüften wir vor der Weiterverwendung unter dem Phasenkontrastmikroskop auf ihren Reinheitsgrad. Von den Mitochondrien- und Mikrosomenfractionen fertigten

uns freundlicherweise Herr Priv.-Doz. Dr. G. Birkmayer vom Institut für Zellbiologie von den ersten 3 Fraktionen elektronenmikroskopische Aufnahmen zur Kontrolle des Reinheitsgrades an.

Die Abbildungen 8 und 9 zeigen je eine Aufnahme einer Mitochondrien- und einer Mikrosomenfraktion. Das Material stammt aus dem Sediment der jeweiligen Fraktion, und wurde zur Weiterverarbeitung in einer gepufferten OsO_4 -Lösung (pH 7,2) fixiert. Mit Material aus dem selben Arbeitsgang wurden die Versuchstiere beimpft. Die Aufnahmen beweisen, daß es mit der angegebenen Methode gelingt, eine gute Trennung der einzelnen Zellbestandteile zu erreichen und saubere Fraktionen zu erhalten.

4.5.6. Proteinbestimmung

Zur besseren Objektivierbarkeit bestimmten wir bei einem Teil der Übertragungen den Proteingehalt nach LOWRY (45).

An Hand von mehreren Testreihen fertigten wir zuerst eine Eichkurve an. Von dem zur Übertragung verwendeten Material entnahmen wir jeweils eine kleine Probe und führten damit die Proteinbestimmungsreaktionen durch. Mit Hilfe der durch das Photometer gewonnenen Extinction, durch Ablesen der Werte aus der Eichkurve und aus dem bekannten Volumen des übertragenen Materials konnten wir die Menge von Protein, die auf die einzelnen Tiere übertragen wurde, berechnen.



ABBILDUNG 2

Bild eines Melanoms, 11 Tage nach der Übertragung.

5.0. E R G E B N I S S E

Die Abbildung 2 zeigt einen Goldhamster mit einem 11 Tage alten Melanom. In der Mitte der Geschwulst ist deutlich ein Aufbrechen der Haut mit der darunter liegenden Zentralnekrose des Tumors zu erkennen.

5.1. ERGEBNISSE BEI DER ÜBERTRAGUNG VON TUMORZELLEN

5.1.1. Legende zu den Tabellen

Die folgenden Tabellen geben die Ergebnisse der Übertragung von Tumorzellen wieder. Die Spalte 1 gibt die Anzahl der Versuchstiere an. In Spalte 2 findet sich die Anzahl der Tumorzellen, die auf jeweils ein Versuchstier übertragen wurde.

Spalte 3 erklärt die Art der Materialübertragung: "sc" bedeutet subcutane, "ip" bedeutet intraperitoneale Übertragung der Tumorzellen. Die 4. Spalte gibt Auskunft, an welchem Tag nach der Überimpfung die ersten Anzeichen eines Tumors registriert wurden, Spalte 5 beschreibt Aussehen und Wachstum der Tumoren. Ab Tabelle 4 wird auf diese Spalte verzichtet, da bei den folgenden Übertragungsmaßnahmen diese Kriterien sich nicht mehr sichtbar zu den vorgenannten Gruppen änderten. Schließlich enthält die letzte Spalte die Überlebenszeit der erkrankten Goldhamster vom Tage der Transplantation an.

5.1.2.1. Gruppe I

TABELLE 1

Anzahl der Tiere	Zellzahl	Impfart	Befund Zeit (Tage) nach Überimpfung	Aussehen des Tumors	Überlebenszeit in Tagen
2	3,2 Mill.	sc	4	groß, Infiltration in	11
2	2,4 Mill.	sc	4	Nachbargewebe, zen-	11
2	1,6 Mill.	sc	5	trale Nekrosen, Zer-	12
2	0,8 Mill.	sc	6	fall	9/12

Bei der ersten Übertragung gingen wir von 3,2 Mill. Zellen pro Tier aus. Durch Verdünnen der Ursprungssuspension erhielten wir 2,4 / 1,6 / 0,8 Mill. Zellen pro Tier. Es wurden jeweils zwei Tiere subcutan geimpft.

Die Tiere dieser Gruppe zeigten schon sehr bald nach der Übertragung erste Anzeichen eines Tumors. Bereits nach vier bis sechs Tagen waren deutliche Knötchen im Fell zu tasten, sichtbar wurden die Tumoren nach sechs bis sieben Tagen. Das Tumorwachstum schritt rapide fort, die Melanome erreichten bereits nach wenigen Tagen solche Ausmaße, daß sich die Tiere nur noch mit Mühe bewegen konnten. Nach drei bis fünf Tagen begannen die Tumoren zentral aufzubrechen und zu zerfallen. Infiltrationen ins Nachbargewebe traten bei 3,2 Mill. Zellen auf. Die Überlebenszeit der Tiere war gering. Sie lag zwischen 9 und 12 Tagen. Auffallend ist hier das zeitliche Zusammentreffen der Todestage. Einzige Ausnahme bei dieser Gruppe war ein Tier mit 0,8 Mill. Zellen, das schon nach 9 Tagen starb.

5.1.2.2. Gruppe II

TABELLE 2

Anzahl der Tiere	Zellzahl	Impfart	Befund Zeit (Tage) nach Überimpfung	Aussehen des Tumors	Überlebenszeit in Tagen
2	$8 \cdot 10^5$	sc	6/7		
2	$6 \cdot 10^5$	sc	6/10		
2	$4 \cdot 10^5$	sc	7	groß, Zentralnekrose	mindestens 15 Tage
2	$2 \cdot 10^5$	sc	10		

Bei der zweiten Gruppe verwendeten wir folgende Zellzahlen: $8 \cdot 10^5$ / $6 \cdot 10^5$ / $4 \cdot 10^5$ und $2 \cdot 10^5$ Zellen. Die Zeitdauer bis zum Auftreten von Tumoranzeichen wird nun schon größer. Die Tiere erkrankten zwischen dem sechsten und zehnten Tag. Auch hier werden die mit gleicher Zellzahl geimpften Tiere praktisch am gleichen Tag krank.

Bei den Tumoren ist noch keine Änderung im Aussehen festzustellen. Auch hier wachsen sie rapide, treten ebenfalls Zentralnekrosen auf. Die Überlebenszeit der Tiere betrug 15 bis 20 Tage.

5.1.2.3. Gruppe III und IV

TABELLE 3

Anzahl der Tiere	Zellzahl	Impfart	Befund Zeit (Tage) nach Überimpfung	Aussehen des Tumors	Überlebenszeit in Tagen
3	$2 \cdot 10^5$	sc	9/10	kleiner, langsamer wach-	22 - 29
3	$1 \cdot 10^5$	sc	13/14	send, Zentralnekrose erst	26 - 32
3	$5 \cdot 10^4$	sc	14	nach 22 Tagen	28 - 41

Anzahl der Tiere	Zellzahl	Impfart	Befund Zeit (Tage) nach Überimpfung	Aussehen des Tumors	Überlebenszeit in Tagen
2	$3 \cdot 10^5$	sc	8	kleiner, langsamer wach-	29 und 31
2	$2 \cdot 10^5$	sc	10	send, Zentralnekrose erst	24 und 32
2	$1 \cdot 10^5$	sc	13/14	nach 22 Tagen	32 und 38

Diese beiden Gruppen lassen sich gut zusammenfassen. Hier lag die Anzahl der subcutan übertragenen Zellen zwischen $3 \cdot 10^5$ und $5 \cdot 10^4$ Zellen. Gruppe IV bestätigt die Ergebnisse von Gruppe III. Die ersten Befunde sind zwischen dem achten und vierzehnten Tag zu finden. Auch hier liegen diese Daten noch sehr eng beieinander. Das Wachstum der Tumoren geht merklich langsamer vonstatten. Sie sind kleiner, kompakter als bei den Vorgruppen. Nekrosebezirke sind zwar noch vorhanden, sie sind aber ebenfalls wesentlich kleiner und treten bedeutend später auf (erst nach 22 Tagen!).

Die Überlebenszeit der Tiere ist gegenüber den Vorgruppen

schon deutlich verlängert. Allerdings gehen die einzelnen Werte jetzt auch weiter auseinander. Sie bewegen sich zwischen 22 und 41 Tagen.

5.1.2.4. Gruppe V

TABELLE 4

Anzahl der Tiere	Zellzahl	Impfart	Befund Zeit (Tage) nach Überimpfung	Überlebenszeit in Tagen
3	50 000	sc	10 - 14	28 - 41
3	30 000	sc	14	26 - 32
3	10 000	sc	14/15	30/32/38

Bei dieser Gruppe von insgesamt neun Tieren übertrugen wir etwa $5 \cdot 10^4$ / $3 \cdot 10^4$ und $1 \cdot 10^4$ Zellen subkutan. Auch hier erhielten wir noch in jedem Fall ein Ergebnis. Als Tag des ersten Befundes ergab sich hier sehr konstant, mit einer Ausnahme, der 14. Tag. Das Wachstum und das Aussehen des Tumors war gegenüber der Gruppe IV kaum verändert. Die Tumoren wuchsen langsamer, ihre zentralen Nekrosen treten sehr spät auf. Sie scheinen insgesamt nicht die Größe der Tumoren, die durch mehrere Millionen Zellen induziert wurden, zu erreichen.

5.1.2.5. Gruppe VI und VII

TABELLE 5

Anzahl der Tiere	Zellzahl	Impfart	Befund Zeit (Tage) nach Überimpfung	Überlebenszeit in Tagen
2	5000	sc	1 Tier; 14	33
2	3000	sc	2 Tiere; 14/16	30 - 33
2	1000	sc	1 Tier; 19	36

Anzahl der Tiere	Zellzahl	Impfart	Befund Zeit (Tage) nach Überimpfung	Überlebenszeit in Tagen
2	10 000	sc	14/15	30 und 38
2	5 000	sc	15/19	32 und 38
2	3 000	sc	17 (nur 1 Tier)	35

Nun erreichten wir mit unserer Zellzahl den Bereich unter 10 000 Zellen. Die Überimpfung erfolgte wieder subcutan. Bei Gruppe VI gab es schon nicht mehr in jedem Fall ein Ergebnis. Jeweils ein Tier mit 5000 und 1000 übertragenen Zellen erkrankte nicht mehr. Hier wurde nun langsam der Grenzbereich für die Tumorübertragung sichtbar.

Bei der Gruppe VII, die daraufhin mit ähnlichen Zellzahlen geimpft wurde, erhielten wir ebenfalls bei einem Tier mit 3000 Zellen kein Ergebnis.

Die ersten Befunde bei den erkrankten Tieren traten zwischen

dem 14. Tag (10 000 Zellen) und dem 19. Tag (5000 und 1000 Zellen) auf, die Überlebensdauer lag zwischen dem 30. und 38. Tag. Auffallenderweise ist die Streuung hier gegenüber der Vorgruppe geringer geworden.

Bei den Tumoren konnte keine Änderung im Aussehen beobachtet werden.

5.1.2.6. Gruppe VIII

TABELLE 6

Anzahl der Tiere	Zellzahl	Impfart	Befund Zeit (Tage) nach Überimpfung	Überlebenszeit in Tagen
2	1000	sc	1 Tier: 16	31
2	500	sc	kein Tier erkr.	
2	100	sc	kein Tier erkr.	
2	1000	ip	1 Tier: 14 (Asc.)	31
2	500	ip	kein Tier erkr.	
2	100	ip	kein Tier erkr.	

Diese Gruppe teilt sich in Tiere, die subcutan und in Tiere, die intraperitoneal mit Tumorzellen infiziert wurden, intraperitoneal jeweils zwei Tiere mit ca. 1000, 500 und 100 Zellen.

Je ein Tier mit 1000 Zellen sc und ip erkrankte noch. Das ip gespritzte Tier erkrankte am 14. Tag an Ascites, das sc gespritzte Tier am 16. Tag. Beide Tiere starben am 31. Tag nach der Überimpfung.

5.1.2.7. Intraperitoneale Übertragung

In einer zusätzlichen Versuchsreihe untersuchten wir auch die Möglichkeit, mit subcutan gewonnenen Tumorzellen, die wir intraperitoneal übertrugen, einen Tumor zu erzeugen. Damit wollten wir ein Zellkulturmilieu nachahmen (52).

Bei diesen Untersuchungen wurde die Anzahl der übertragenen Zellen nicht bestimmt. Wir verwendeten hier die übliche, im Bereich von mehreren Millionen liegende Menge, die wir auch bei der unkontrollierten Übertragung zur Fortführung des Tumors gebrauchten.

Unsere Tiere erkrankten innerhalb eines Zeitraumes von 4-7 Tagen an Ascites. Ihre Überlebenszeit betrug etwa 14 Tage.

Wir punktierten diesen Ascites und übertrugen die Flüssigkeit subcutan auf zwei gesunde Hamster. Beide Tiere erkrankten nach 10 bzw. 12 Tagen an einem Hauttumor mit allen Anzeichen der bekannten Tumorart. Die aus diesen Tumoren gewonnenen Zellen erzeugten, auf andere Hamster übertragen, wiederum Melanome.

Vier weitere Tiere impften wir mit etwa 1 Mill. Zellen des ursprünglichen Tumors und erregten nach etwa 7-8 Tagen bei allen Tieren Ascites. Die Tiere wurden am 11. Tag getötet, die Ascitesflüssigkeit gewonnen und bei 3000 Upm für 10 Minuten in der Sorvallzentrifuge zentrifugiert. Von dem Überstand wurden je 0,5 ml an 9 Tiere und an 3 Tiere je 1 ml subcutan übertragen.

Von den ip gespritzten Tieren erkrankten 2 an Ascites, die sc gespritzten Tiere blieben ohne Befund.

Das Sediment der Ascitesflüssigkeit wurde in Kochsalzlösung gewaschen, erneut zentrifugiert und schließlich in frischer physiologischer NaCl-Lösung aufgenommen. Bei der Untersuchung unter dem Mikroskop stellte sich heraus, daß es sich um reine Tumorzellen handelte. Wir überimpften diese Zellen an 13 Tiere intraperitoneal in verschiedenen Verdünnungen. Dabei betrug die Anzahl der Zellen zwischen 3,8 Millionen und 50 000. Von diesen 13 Tieren erkrankten 12 Tiere im Verlauf von 1-2 Wochen an Ascites.

Subcutan impften wir 7 Tiere mit 1-2 Millionen Zellen aus dem Niederschlag. Alle 7 Tiere erkrankten im Verlauf von 5-7 Tagen.

5.1.2.8. Zusammenfassung aller Gruppen

TABELLE 7

Anzahl der Tiere	Zellzahl	Erkrankungstag	Überlebenszeit Mittelwert
2	$3,2 \cdot 10^6$	4.	11
5	$2,4 \cdot 10^6$	4.	11,5
2	$1,6 \cdot 10^6$	5.	12
4	$8 \cdot 10^5$	6./7.	13,5
2	$6 \cdot 10^5$	6./10.	15
2	$4 \cdot 10^5$	7.	-
2	$3 \cdot 10^5$	8.	30,0
7	$2 \cdot 10^5$	9./10.	28,5
5	$1 \cdot 10^5$	13./14.	30,6
6	$5 \cdot 10^4$	14.	32,2
3	$3 \cdot 10^4$	14.	31,2
5	$1 \cdot 10^4$	14./15.	33,3
4	$5 \cdot 10^3$	14./15./19. erkr. 3	34,3
4	$3 \cdot 10^3$	14./16./17. erkr. 3	33,4
6	$1 \cdot 10^3$	16./19. erkr. 3	33,5
4	500	- -	-
4	100	- -	-

5.1.3. Auswertung der Untersuchungsergebnisse

5.1.3.1. Tumorstadium

Bei der Übertragung von 10^6 und mehr Zellen erhalten wir immer und zwar sehr schnell, innerhalb von 4-7 Tagen, einen Tumor. Beginnend als kleines, kaum tastbares Knötchen, wächst er in weiteren 5-7 Tagen zu einer walnußgroßen Geschwulst heran. Je niedriger die Zahl der übertragenen Zellen ist, desto langsamer geht auch das Wachstum des Tumors voran. Auch sein Aussehen ändert sich. Während bei 3,2 Millionen Zellen das rapide Wachstum, die großen zentralen Nekrosen imponieren und auch eine gewisse Infiltration in die Nachbargewebe zu erkennen ist, geht das Wachstum des Tumors bei den Zellzahlen unter 100 000 relativ langsam vonstatten. Die Melanome erscheinen solider, kompakter. Nekrosen treten erst viel später und in geringerem Maße auf. Nun erscheinen die Geschwülste makroskopisch abgegrenzt im Gegensatz zu den deutlich sichtbaren Infiltrationen bei den hohen Zellzahlen.

5.1.3.2. Krankheitsbeginn, Überlebenszeit

Bei der Übertragung von 10^6 und mehr Zellen erkrankten die Tiere sehr bald nach der Transplantation. Der Krankheitsbeginn manifestiert sich bereits am 4. und 5. Tag. Die Überlebenszeit ist sehr gering, 11 oder 12 Tage. Während die Lebenserwartung eines halbjährigen, normalen und gesunden Goldhamsters etwa 2-3 Jahre beträgt, starben unsere erkrankten Tiere innerhalb weniger Tage oder Wochen

nach der Übertragung. Auffallend ist das zeitliche Zusammen-
treffen von Krankheitsbeginn und Todestag bei den einzelnen,
mit gleichen Zellzahlen behandelten Tieren. Sie erkrankten
und starben beinahe im gleichen zeitlichen Abstand vom Ta-
ge der Transplantationsmaßnahme an. Die Zeitpunkte des
ersten Befundes und die Überlebenszeiten zeigen nur eine
ganz geringe Breite, beide sind bei gleicher Anzahl von Tu-
morzellen außerordentlich konstant. Je höher die induzierte
Menge von Tumorzellen ist, desto geringer ist die Streuung
in der Überlebenszeit. Nach einer Inoculation von $1,6 \cdot 10^6$
- $3,2 \cdot 10^6$ Zellen erkrankten die Tiere am 4. und 5. Tag
und starben nach 11-12 Tagen. Mit sinkender Zellzahl stei-
gen Überlebensdauer und Streuung an. Auch der Krankheits-
beginn schiebt sich hinaus.

Zeichnet man Erkrankungstag und Überlebenszeit der Tiere
in Abhängigkeit von der übertragenen Zellzahl in ein Schau-
bild, so erhält man in beiden Fällen eine deutlich absinken-
de Kurve. Sie hat bei beiden Daten die gleiche Verlaufsrich-
tung und zeigt eine gewisse Parallelität (s. Abb.3).

Die Tiere überlebten im Mittel bei

$1,6 \cdot 10^6$ Zellen	12,0 Tage
$2,0 \cdot 10^5$ Zellen	28,0 Tage
$1,0 \cdot 10^4$ Zellen	33,3 Tage
$1,0 \cdot 10^3$ Zellen	33,5 Tage

(s. Tabelle 7).

Die Überlebenszeit nimmt allerdings nicht in dem Maße zu,
wie die Zellzahl abnimmt. Setzen wir den Mittelwert der

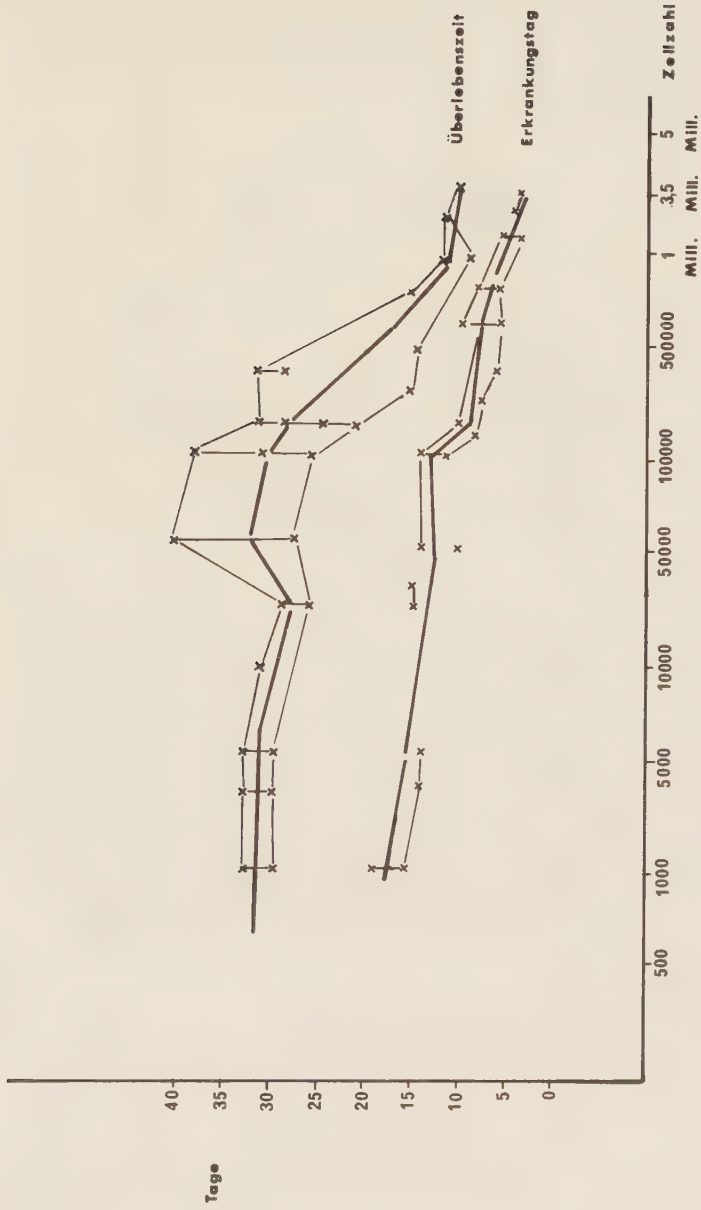


ABBILDUNG 3

Erkrankungstag und Überlebenszeit der Goldhamster in Abhängigkeit von der übertragenen Zellzahl

Überlebenszeit in Beziehung zur Anzahl der übertragenen Tumorzellen, so wird ein asymptotischer Verlauf der Kurve sichtbar. Die Linie nähert sich einem Mittelwert zwischen 33,5 und 34 Tagen.

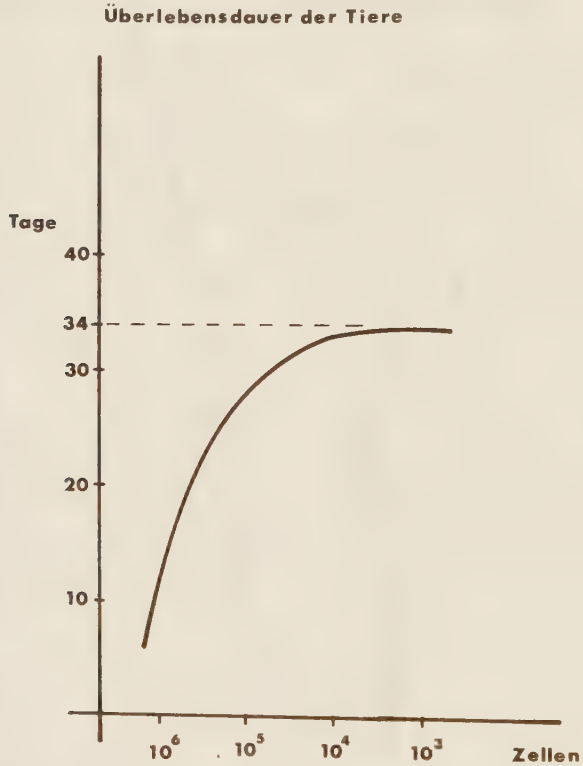


ABBILDUNG 4

Durchschnittliche Überlebensdauer der Tiere nach ca. 10^3 , 10^4 , 10^5 und 10^6 Tumorzellen

5.1.3.3. Angehrate

Während wir bei Zellzahlen von 10^5 und mehr noch in jedem Fall einen Tumor erzeugen konnten, führte im Bereich unter 10 000 Zellen schon nicht mehr jede Übertragung zu einem Ergebnis. Offensichtlich ist eine Anzahl von 5000 und weniger Zellen nicht mehr ausreichend, um mit Sicherheit einen Tumor innerhalb der Beobachtungszeit zu erzeugen.

TABELLE 8

Anzahl der Tiere	Zellzahl	Zahl der erkrankten Tiere	Angehrate
4	5000	3	75 %
4	3000	3	75 %
6	1000	3	50 %
4	500	-	-
4	100	-	-

Wie Tabelle 8 zeigt, nimmt die Angehrate bei unseren Untersuchungen drastisch ab, je weniger Zellen wir übertrugen. Während bei 5000 Zellen noch eine Angehrate von 75 % erzielt werden konnte, erhielten wir bei 500 und 100 Zellen überhaupt kein positives Ergebnis mehr.

5.2. ERGEBNISSE DER ZELLÜBERTRAGUNG BEI GLEICHZEITIGER PROFLAVINGABE

Wir untersuchten den Einfluß von Proflavin auf das Tumorzellwachstum und die Überlebenszeit an 3 Gruppen mit insgesamt 15 Tieren.

Die Tiere waren subcutan am Rücken geimpft und anschließend täglich bis zum Ausbruch der Krankheit untersucht worden.

5.2.1. Ergebnisse

TABELLE 9

1. <u>Kontrollgruppe:</u> <u>Proflavingruppe:</u> (10 mg/kg/KG)	3 Tiere	2,6 Mill. Zellen	4. Tag	11 - 12 Tage
	3 Tiere	2,6 Mill. Zellen	7. Tag	18 - 31 Tage
2. <u>Kontrollgruppe:</u> <u>Proflavingruppe:</u> (24 mg/kg/KG)	2 Tiere	ca. 2 Mill. Zellen	5. Tag	12 und 14 Tage
	3 Tiere	ca. 2 Mill. Zellen	6./8. Tag	20/26/27 Tage
3. <u>Kontrollgruppe:</u> <u>Proflavingruppe:</u> (24 mg/kg/KG)	2 Tiere	2,3 Mill. Zellen	5. Tag	12 und 14 Tage
	2 Tiere	2,3 Mill. Zellen	8. Tag	24 - 26 Tage

5.2.2. Erkrankungszeit und Überlebenszeit

Auf die erste Gruppe übertrugen wir 2,6 Millionen Zellen. Die Tiere erhielten eine Tagesdosis von 10 mg/kg Körpergewicht. Bei der proflavinfreien (Kontrollgruppe) fanden wir

die ersten Hautknötchen nach 4, bei den Tieren der Proflavingruppe nach 7 Tagen. Die Überlebenszeit der Tiere der Kontrollgruppe betrug 11-12 Tage vom Tage der Überimpfung an, die mit Proflavin behandelten Tiere lebten 18 bis 31 Tage.

Bei der zweiten und dritten Gruppe erhielten die Tiere etwa 2 Millionen bzw. 2,3 Millionen Zellen. Die tägliche Proflavindosis wurde erhöht. Die Tiere erhielten jetzt pro Tag 2,4 mg Proflavin, das entspricht einer Proflavinmenge von 24 mg/kg Körpergewicht. Die Ergebnisse waren - wie anhand der Tabelle zu erkennen ist - denen des ersten Versuchs sehr ähnlich:

Während die Tiere der Kontrollgruppe am 5. Tag erkrankten und zwischen dem 12. und 14. Tag starben, zeigten sich bei den mit Proflavin behandelten Tieren die Tumoren erst zwischen dem 6. und 8. Tag. Der Zeitraum bis zum Exitus betrug zwischen 20 und 27 Tagen. Zwar erkrankten die mit Proflavin behandelten Tiere ebenfalls an einem Melanom, jedoch erscheint der Zeitraum bis zum Auftreten der ersten Krankheitsanzeichen im Vergleich zu den unbehandelten Tieren der Kontrollgruppen etwas verlängert. Nicht zu übersehen ist die längere Überlebenszeit der mit Proflavin getränkten Tiere. Sie beträgt im Mittel nahezu das Doppelte der Überlebenszeit der unbehandelten Tiere.

- 5.2.3. Trägt man die Tage einer ersten Befunderhebung bei den un-
behandelten und mit Proflavin getränkten Tieren in eine Gra-
phik ein, so erkennt man deutlich, daß die Befunde bei den
Proflavin-behandelten Gruppen erst später zum Vorschein
kommen.

Der Mittelwert bei den unbehandelten Tieren beträgt 4,6 Ta-
ge, bei den behandelten Tieren 7,3 Tage.

Bei der Überlebenszeit wird der Vorsprung der Proflavin-
behandelten Tiere noch deutlicher: Hier ist das Verhältnis
24,6 Tage zu 12,5 Tagen.

5.3. ERGEBNISSE DER ZELLFREIEN ÜBERTRAGUNG

Im dritten Abschnitt unserer Versuchsreihen prüften wir die
Übertragbarkeit einzelner Zellbestandteile. Im folgenden ge-
ben auch hier Tabellen Einzelheiten der Versuchsergebnisse
wieder.

5.3.1. Legende zu den Tabellen

Reihe 1 gibt die Anzahl der Versuchstiere an, Spalte 2 ent-
hält die Menge des auf die Versuchstiere übertragenen Mate-
rials. In Reihe 3 findet sich die auf die Hamster übertrage-

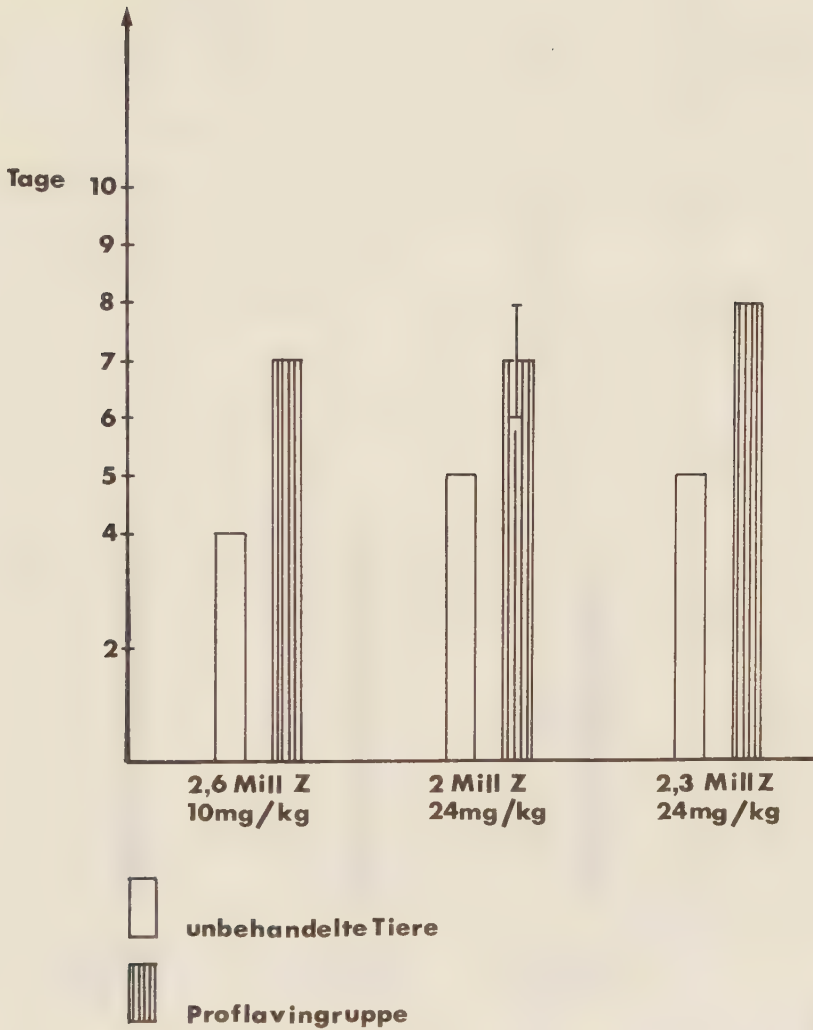


ABBILDUNG 5

Erkrankungstag von unbehandelten Kontrolltieren und mit Proflavin behandelten Goldhamstern

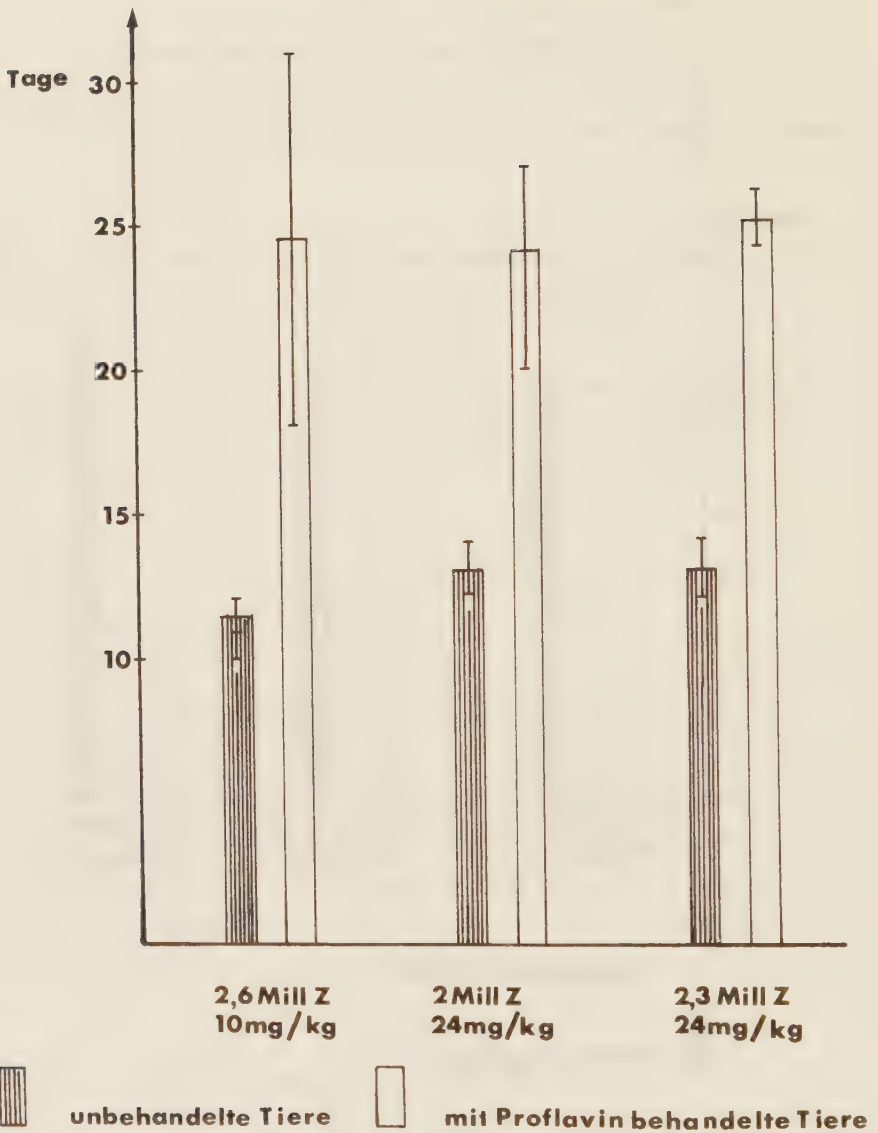


ABBILDUNG 6

Überlebensdauer von A Mel 3 geimpften Goldhamstern mit und ohne gleichzeitiger Proflavingabe

ne Proteinmenge. Da sie nicht für jede Übertragung bestimmt wurde, sind hier einzelne Gruppen ohne Proteinangabe.

Spalte 4 gibt an, wieviele der Versuchstiere an einem Tumor oder an Ascites erkrankten. Die beiden letzten Reihen bezeichnen Erkrankungstag und Überlebenszeit der erkrankten Tiere. Sie wurden nicht in jedem Fall eruiert, da das Hauptaugenmerk darauf gerichtet war, ob die Tiere überhaupt einen Tumor bekämen.

5.3.2. Zellkerne

TABELLE 10

Zellkerne subcutan

Anzahl der Tiere	Material in ml	Material in mg Protein	Zahl der erkrankten Tiere	Erkrankungstag	Überlebenszeit
2	0,7		1	10.	22 Tage
2	1,0		2	12./12.	
4	1,0	9,6	4	5./7./9.	18 - 19 Tage
4	0,5	20,0	4	7./7./12./14.	14 - 20 Tage
3	0,7		3	6./11./11.	ca. 20 Tage
4	0,7	11,2	4	8./8./10./10.	

TABELLE 11
Zellkerne intraperitoneal

Anzahl der Tiere	Material in ml	Material in mg Protein	Zahl der erkrankten Tiere	Erkrankungstag	Überlebenszeit
2	0,7		1	14.	
2	0,7	6,8	2	9./14.	19 Tage
4	0,5	20,0	4	7./12./12./12.	12 - 20 Tage
6	0,7		4	11./11./13./13.	18 - 20 Tage
4	0,7	11,2	4	10./10./12./12.	

Bei der subcutanen Übertragung erkrankten von 19 Tieren 18, das entspricht einer Quote von 94,7 %. Bei der intraperitonealen Transplantation erkrankten von 18 Hamstern 15. Die Krankheitsquote beträgt hier 83,4 %.

5.3.3. Mitochondrien

TABELLE 12
Mitochondrien subcutan

Anzahl der Tiere	Material in ml	Material in mg Protein	Zahl der erkrankten Tiere	Erkrankungstag	Überlebenszeit
2	0,7		0	-	-
2	0,5		0	-	-
2	0,5	4,4	1	24.	30 Tage
2	0,7	ca. 13	0	-	-
3	1,0		1	9.	
2	0,9	13,2	1	10.	25 Tage

Von 13 Tieren erkrankten 3, das sind 23 %.

TABELLE 13

Mitochondrien intraperitoneal

Anzahl der Tiere	Material in ml	Material in mg Protein	Zahl der erkrankten Tiere	Erkrankungstag	Überlebenszeit
2	0,5		-	-	-
2	0,5	4,4	-	-	-
2	0,7	13	-	-	-
2	0,7	8,7	-	-	-
2	0,7	10,2	-	-	-

Von den 12 Versuchstieren erkrankte keines.

5.3.4. Mikrosomen

TABELLE 14

Mikrosomen subcutan

Anzahl der Tiere	Material in ml	Material in mg Protein	Zahl der erkrankten Tiere	Erkrankungstag	Überlebenszeit
2	1,0	11,0	1	5.	30 Tage
2	1,0	20,0	2	20.	22 Tage
4	0,7		1	17.	-
2	1,0	15,6	1	20.	-

Hier erkrankten von 10 gespritzten Tieren 5. Das ist eine Quote von 50 %.

TABELLE 15

Mikrosomen intraperitoneal

Anzahl der Tiere	Material in ml	Material in mg Protein	Zahl der erkrankten Tiere	Erkrankungstag	Überlebenszeit
4	0,7		-	-	-
2	0,5		-	-	-
3	1,0	20,0	2	12./20.	31 Tage/-
4	0,7	13,4	1	14.	23 Tage
2	1,0	15,6	1	20.	-

Hier wurden insgesamt 15 Tiere geimpft, es erkrankten 4 Tiere. Das entspricht einem Prozentsatz von 27,7 %.

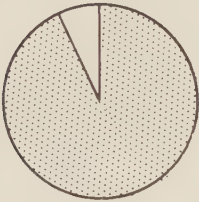
5.3.5. Elektronenmikroskopische Aufnahmen

Die Abbildungen 8 und 9 sind elektronenmikroskopische Aufnahmen der Mitochondrien- und Mikrosomenfraktion nach den oben beschriebenen Präparationsmethoden. Diese Bilder sowie auch die anderen in der Arbeit enthaltenen elektronenmikroskopischen Aufnahmen wurden für uns freundlicherweise von Herrn Priv.-Doz. Dr. G. D. Birkmayer (Institut für Zellbiologie, München) angefertigt.

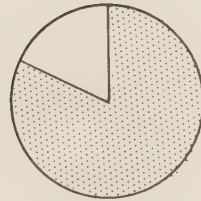
Sie dienen zur Überprüfung des Reinheitsgrades der Organellen und beweisen, daß es mit der angegebenen Methode gelingt, die einzelnen Zellbestandteile zu trennen und saubere Fraktionen zu erhalten.

Abbildung 8 zeigt eine Vielzahl von Mitochondrien aus dem Hamstermelanom. Die meisten Organellen sind unbeschädigt

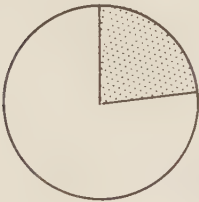
Zellkerne sc 94,7 %



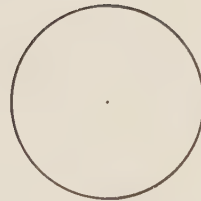
ip 83,4 %



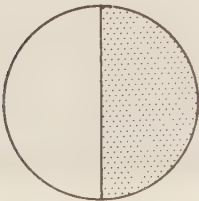
Mitochondrien sc 23,1 %



ip 0 %



Mikrosomen sc 50 %



ip 27,7 %

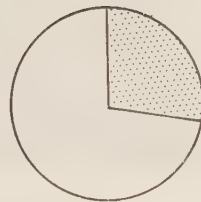


ABBILDUNG 7

Ergebnisse der zellfreien Übertragung. Erfolgsquote in %.

und deutlich erkennbar, einige wenige haben offensichtlich durch die Fixierungsvorgänge gelitten und erscheinen etwas verändert.

Abbildung 9 zeigt uns ein Bild der Mikrosomenfraktion. Auch hier ist der hohe Reinheitsgrad der Kernteilchen deutlich sichtbar.

Zusammenfassend noch einmal die Ergebnisse bei der zellfreien Übertragung:

Die einzelnen Fraktionen wurden den Versuchstieren entweder intraperitoneal oder subcutan im Rückenbereich injiziert.

Insgesamt beimpften wir für diese Versuchsserie

a) mit Zellkernen

sc 19 Tiere, davon erkrankten 18

ip 18 Tiere, davon erkrankten 15

b) mit Mitochondrien

sc 13 Tiere, davon erkrankten 3

ip 12 Tiere, davon erkrankten -

c) mit Mikrosomen

sc 10 Tiere, davon erkrankten 5

ip 15 Tiere, davon erkrankten 4.

Das pro Tier übertragene Material enthielt die folgenden Proteinmengen:

a) Zellkerne: 6,8 - 30,0 mg

b) Mitochondrien: 4,4 - 13,2 mg

c) Mikrosomen: 5,5 - 20,0 mg.



ABBILDUNG 8

Elektronenmikroskopische Aufnahme der Mitochondrienfraktion.

Vergrößerung: 18 700 x

Aufnahme: G. D. Birkmayer



ABBILDUNG 9

Elektronenmikroskopische Aufnahme der Mikrosomenfraktion.

Vergrößerung: 18 700 x

Aufnahme: G. D. Birkmayer

Abbildung 10 zeigt eine Ausschnittvergrößerung der Mikrosomenfraktion von Abbildung 9 mit einzelnen, deutlich zu erkennenden virusähnlichen Partikelchen, die meist kreisförmig sind und die im Inneren eine Wagenradstruktur aufweisen.

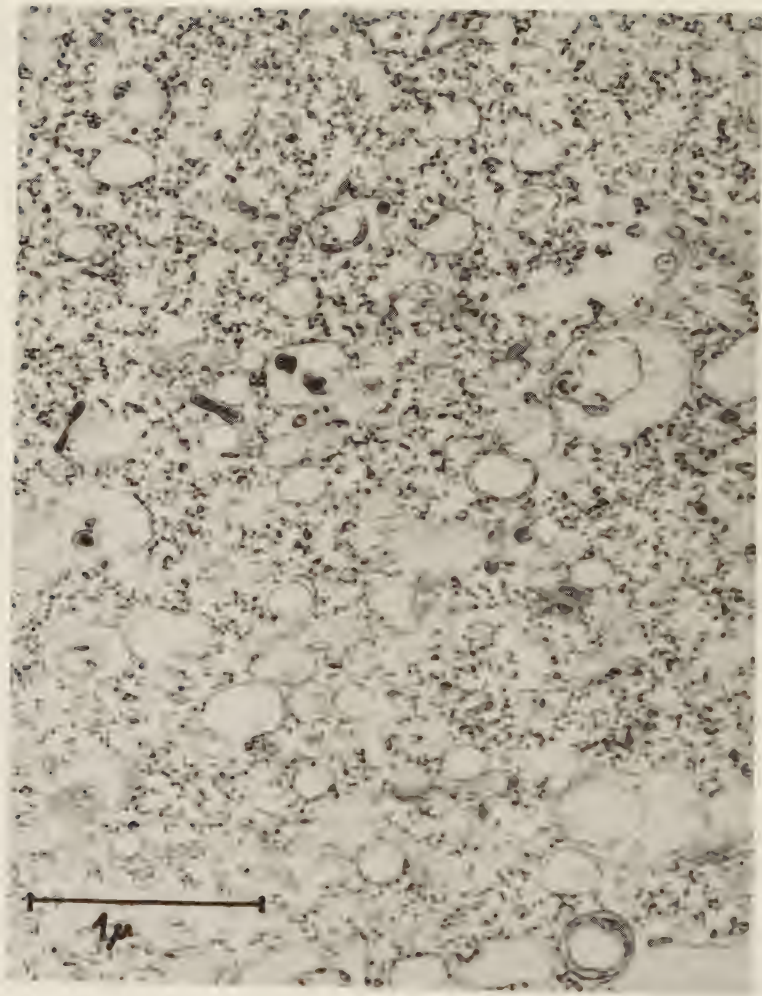


ABBILDUNG 10

Virusartige Partikel in einer Mikrosomenfraktion.

Vergrößerung: 42 000 x

Aufnahme: G. D. Birkmayer

6.0 DISKUSSION

Bei diesem von uns untersuchten, nicht pigmentierten Hamstermelanom A Mel 3 handelt es sich um einen sehr rasch wachsenden und stark metastasierenden Tumor.

Wir wollen uns nun im folgenden kritisch mit den von uns gefundenen Ergebnissen zu dessen Übertragbarkeit auseinandersetzen.

6.1. BESCHAFFENHEIT DES TUMORS

Wie anhand der ersten Ergebnisse zu sehen ist, ist das Tumorstadium mit abhängig von der Anzahl der übertragenen Zellzahlen. Bei sehr hohen Zellzahlen tritt die Geschwulst sehr schnell auf und führt nach einem rapiden Wachstum auch sehr schnell zum Tode, während bei Zellzahlen unter 100 000 das Wachstum erst später (nach ca. 2 Wochen) beginnt und relativ langsam vonstatten geht.

WOHLRAB und PEKER (78), die das Gewicht der Hamstertumoren in Abhängigkeit von der übertragenen Zellzahl untersuchten, machten sehr ähnliche Beobachtungen. Sie stellten nach einem vierzehntägigen Wachstum einen deutlichen Zusammenhang der Gewulstgröße mit der Anzahl der zugeführten Zellen fest.

Betrachtet man Aussehen und Wachstum der Tumoren aus der Sicht der tierexperimentellen Untersuchungen, so kommt man zu dem Schluß, daß die günstigsten Wachstumsbedingungen sowohl für Untersuchungen als auch für die Weiterverwendung bei Übertragungsmaßnahmen bei denjenigen Geschwülsten zu finden sind, die durch etwa $0,5 - 1,5 \cdot 10^6$ Zellen induziert wurden. Hier finden sich optimal gewachsene Tumoren in einer relativ kurzen Zeitspanne vom Überimpfen bis zu ihrer vollen Ausbildung.

6.2. ÜBERLEBENSZEIT

Vergleicht man die durchschnittliche Lebensdauer eines gesunden Goldhamsters - sie beträgt etwa drei Jahre - mit den etwa drei Wochen eines an diesem Tumor erkrankten Tieres, so wird deutlich sichtbar, wie bösartig diese Art von Geschwulst ist.

STÄUBLI und LOUSTALOT (68) geben als durchschnittliche Überlebenszeit der von ihnen untersuchten Hamster 21 ± 4 Tage an, ROSENBERG et al. (60) errechneten bei ihren Versuchen $38,7 \pm 4,2$ Tage bei einer Streuung von 22-88 Tagen.

Die mittlere Überlebenszeit aller unserer Versuchstiere betrug 25,6 Tage, schwankend zwischen 12 und 41 Tagen, wobei wir feststellen konnten, daß die Anzahl der übertragenen Zellen einen direkten Einfluß auf diesen Zeitraum hat. Je niedriger die Zahl der transplantierten Zellen ist, desto höher ist die Überlebenszeit.

Man kann die oben genannten Werte, die ja doch gewisse Abweichungen voneinander zeigen, nicht unmittelbar miteinander vergleichen, da die Schwerpunkte bei den einzelnen Untersuchungen verschieden gelagert waren.

So machen STÄUBLI und LOUSTALOT keine Angaben über Alter und Gewicht ihrer Versuchstiere und über die Menge des transplantierten Tumormaterials. Die Beschreibungen von ROSENBERG et al. sind etwas detaillierter. Sie geben das Alter ihrer Tiere mit mehr als 5 Monaten und deren Gewicht mit über 100 g an. Jedoch sind die Mengen des übertragenen Materials ebenfalls nicht exakt zu ermitteln. Nach ihrem Bericht verpflanzten sie "fragments of melanoma measuring about 5 mm in greatest diameter" und vermuteten dabei, daß dies etwa $1 - 4 \cdot 10^5$ durch Trypsinierung gewonnener Tumorzellen entspricht.

Eine gewisse Vergleichsmöglichkeit ergibt sich aus der Arbeit von OTT (53), der ein ebenfalls von FORTNER beschriebenes melanotisches Hamstermelanom mit der Bezeichnung M Mel 1 untersuchte. Zwar kann man beide Tumoren nicht direkt miteinander vergleichen, doch sind die Ergebnisse einer gemeinsamen Betrachtung wert. Bei OTT findet sich ebenfalls eine Abhängigkeit der Überlebensdauer von der Anzahl der injizierten Zellen. Er gibt folgende Zeiten für seine Versuchstiere an:

bei 10^6 Zellen	13 $\pm$ 2	Tage
bei 10^5 Zellen	17 $\pm$ 3	Tage
bei 10^4 Zellen	23 $\pm$ 5,6	Tage
bei 10^3 Zellen	28 $\pm$ 10	Tage.

Hier unsere Werte zum Vergleich: Die Tiere überlebten im
mittel bei circa

10^6 Zellen	12 Tage
10^5 Zellen	28 Tage
10^4 Zellen	33,3 Tage
10^3 Zellen	33,5 Tage.

In beiden Fällen wird die Streuung umso größer, je niedriger
die Anzahl der Tumorzellen gewählt wird.

In Abbildung 3 erkennt man in der Linie, die die Überlebenszeit der Versuchstiere angibt, bei etwa 50 000 Zellen einen Knick. Hier nimmt die durchschnittliche Lebenserwartung der Tiere etwas ab, um dann wieder anzusteigen. Wir führen dies auf die Tatsache zurück, daß wir von diesem Zeitpunkt der Untersuchungen ab jüngere und leichtere Tiere, wie schon oben erwähnt, verwendeten. Es mag sein, daß diese Tiere den älteren nicht ganz gleichzustellen sind und eine größere Anfälligkeit gegenüber dem Tumor aufweisen.

Neben der Tatsache, daß die Überlebenszeiten von Versuchstieren, die mit gleicher Zellzahl geimpft worden waren, sehr nahe beieinanderliegen, ist auch noch die Feststellung interessant, daß die Steigerungsrate der durchschnittlichen Überlebensdauer bei abnehmenden Zellzahlen immer geringer wird.

Bei einer Darstellung der Überlebenszeiten in einem halblogarithmischen Maßstab ergibt sich für unsere Werte deutlich ein exponentieller Verlauf der Kurve mit einem Grenzwert

bei etwa 34 Tagen (Abb.4). Das würde bedeuten, daß die Dauer der Krankheit bei abnehmender Zellzahl nicht mehr weiter steigen würde und die Überlebenszeiten nach der Inoculation bzw. dem Auftreten eines Tumors offensichtlich in einem gewissen Rahmen begrenzt wird.

Diese Kurve würde eher gegen die Vermutung, daß es einen Bereich gibt, innerhalb dessen wir mit übertragenen Zellen kein Melanom mehr induzieren können, sprechen.

6.3. ANGEHRATE UND LETALDOSIS

Auch die Angehraten sind einiger Überlegungen wert. Unseres Wissens liegen bisher dazu keine detaillierten Angaben vor. Alle vorliegenden Berichte sprechen nur von einer hohen, ja sogar 100 %igen Transplantierbarkeit dieses Melanoms (28, 56, 60, 78). Das trifft zweifelsohne zu, solange eine große Menge von Tumormaterial übertragen wird. Tatsächlich erhielten wir in jedem Fall einen Tumor, wenn 10^5 oder mehr Zellen inoculiert wurden.

Im Bereich von weniger als 10^4 Zellen führte jedoch schon nicht mehr jede Transplantation zu einem Ergebnis. Die Angehrate nahm merklich ab, je geringer die Anzahl der Tumorzellen gewählt wurde.

Die von OTT (53) gemachten Untersuchungen am Melanom M Mel 1 scheinen diesen Sachverhalt zu bekräftigen.

Auf Grund seiner, auf einer viel größeren Anzahl von Versuchstieren (mehrere Hundert) beruhenden Untersuchungen erhielt er folgende Angehraten:

10^4 Zellen	85 %
10^3 Zellen	35 %
10^2 Zellen	3,6 %.

Zum Vergleich unsere Werte:

10^4 Zellen	75 %
10^3 Zellen	50 %.

Auch bei der Ermittlung der Letaldosis LD 50 zeigt sich eine Übereinstimmung. Bei unseren Versuchen liegt sie bei $1,0 \cdot 10^3$ Zellen, OTT bestimmte sie für das von ihm untersuchte Melanom auf $1,5 \cdot 10^3$ Zellen.

Nimmt man zu unseren Ergebnissen, die ja auf Grund der zahlenmäßig geringen Maßnahmen keine gesicherte statistische Aussage erlauben und nur einen gewissen "Trend" markieren, die Ergebnisse von OTT zu Hilfe, so läßt sich folgendes Fazit daraus ziehen:

Die Frage nach einem Grenzbereich für eine Tumorübertragung läßt sich nicht in einer einfachen Darstellung beantworten. Anhand dieser Ergebnisse würden wir eher an eine andeutete Grenze, aber an keinen Grenzbereich in der absoluten Form, daß man sagen könnte: ab dieser Zellzahl erzeugt man einen Tumor, darunter nicht, glauben.

Die Versuchsergebnisse deuten eher in die Richtung, nach

der es eine untere Grenze nicht gibt, daß zwar der Prozentsatz der positiven Ergebnisse geringer wird, aber, wenn nur genügend viele Übertragungsmaßnahmen durchgeführt werden, es durchaus möglich erscheint, auch mit geringsten Zellzahlen noch einen Tumor zu erzeugen.

Viel eher läßt sich schon eine relative Grenze für die Tumorübertragung, die vor allem im Hinblick auf die experimentelle Tumorforschung von Bedeutung sein könnte, festsetzen. Sie müßte etwa bei 10^4 Zellen verlaufen. Unsere Versuche ergaben bei Übertragungsmaßnahmen mit größeren Zellzahlen immer ein Ergebnis, während mit weniger Zellen nicht mehr in jedem Fall ein Tumor zu erzeugen war.

Am ehesten scheinen sich diese letzten Ergebnisse mit einer Art "Alles oder Nichts" Prinzip erklären zu lassen.

Wenn es erst einmal zur Ausbildung eines Tumors gekommen ist, dann ist sein Wachstum nicht mehr aufzuhalten und das Tier hat nur noch eine begrenzte, relativ genau zu bestimmende Lebenserwartung.

Das könnte theoretisch bedeuten, daß, wenn alle günstigen Voraussetzungen vorhanden wären, wie hoch virulente Tumorzellen und vor allem keine Abwehrreaktion von seiten des Tieres, ein Tumor nur mit einer einzigen Zelle übertragbar wäre. So aber scheinen eher immunologische Vorgänge des einzelnen Tieres die Grenze zu bestimmen, ab der ein Implantat erfolgreich ist.

Schließlich sei noch der Hinweis auf die Möglichkeit, daß dieser Tumor sich auch intraperitoneal ausbilden kann und auf diese Weise übertragbar ist, gegeben. Diese Art von Tumor könnte vor allem für die Weiterverbreitung im Tierversuch interessant werden. Hier vereinfacht sich die Aufbereitung der Geschwulst wesentlich und man könnte in bestimmten Fällen auf die Übertragung mit Hilfe von zerkleinerten und zerstückelten soliden Tumoren ganz verzichten.

Die arbeits- und zeitaufwendigen Vorgänge wie Präparation des Tumors, Beseitigen der Nekrosen, Waschen, Homogenisieren etc. würden entfallen. Die Ascitesflüssigkeit enthält in hohem Maße Tumorzellen, die durch einfaches Auszentrifugieren zu gewinnen sind. Gerade im Hinblick auf die notwendig hohen Ausgangsmengen an Tumormaterial für die Gewinnung von virusähnlichen Partikelchen aus dem Melanom könnte diese Tumorform für die experimentelle Forschung interessant erscheinen.

6.4. PROFLAVINGABE

Im Anschluß an die Übertragung von Tumorzellen wurde ein Versuch unternommen, bei dem die Tiere vom Tag der Zellübertragung an gleichzeitig mit Proflavin behandelt wurden. Die Tiere wurden unter den gleichen Bedingungen wie die Vorgruppe gehalten, die Anzahl der übertragenen Zellen betrug etwa zwei Millionen. Die Ergebnisse zeigen, daß sowohl der Ausbruch der Krankheit als auch die Überlebens-

dauer gegenüber der unbehandelten Kontrollgruppe hinausgeschoben sind. Die Überlebenszeiten zeigen dies deutlich. Sie betragen fast das Doppelte der Zeit, die die nicht geimpften Tiere überlebten.

Es scheint, daß die *in vitro* schon seit längerer Zeit nachgewiesene Beeinflussung von Stoffwechselvorgängen bei der Proteinsynthese (37, 48), die BALDA und BIRMAYER (1, 2, 7, 9) insbesondere auch für das Hamstermelanom unter anderem als Hemmung der DNS-RNS-Synthese bereits bestätigten, auch *in vivo* seine Gültigkeit hat.

Daß es sich dabei nicht um toxische und unspezifische Phänomene, die aufgrund des breiten Wirkungsspektrums von Proflavin entstehen, handelt, wurde von BALDA und BIRMAYER in einer jüngeren Untersuchung postuliert, wobei sie die Annahme vertraten, daß die von ihnen beobachtete Proflavinwirkung auf den Nucleinsäure- und Proteinstoffwechsel dieses Hamstermelanoms spezifischer Natur ist (5).

Ihre Untersuchungen finden jetzt durch diese *in vivo* gewonnenen Ergebnisse eine Bekräftigung.

6.5. ZELLFREIE ÜBERTRAGUNG

Für einige Tumoren ist der Nachweis einer zellfreien Übertragung bereits gelungen (29, 50, 58, 61, 70, 83) und auch über eine zellfreie Transplantation bei einem Melanom liegt eine

Arbeit vor (23). Bei dem Hamstermelanom A Mel 3 stand dieser Nachweis bis jetzt aus.

Schon bei den vorhergegangenen Untersuchungen war es uns gelungen, mehr oder weniger zufällig, durch die Übertragung des Überstandes einer auszentrifugierten Ascitesflüssigkeit eines mit diesem Tumor infizierten Tieres einen Tumor zellfrei zu transplantieren (vergl. 5.1.2.7.) Der endgültige Beweis jedoch wurde erst in einer Reihe von Übertragungsmaßnahmen mittels Zellkernen, Mitochondrien und Mikrosomen erbracht, wobei die Ergebnisse bei den einzelnen Fraktionen durchaus unterschiedlich waren.

6.5.1. Zellkerne

Hatten wir, wie schon zuvor geäußert, Zusammenhänge zwischen virusähnlichen Partikelchen und der Induktion von Melanomen vermutet, und unser Hauptaugenmerk auf die diese Partikelchen beinhaltende Mikrosomenfraktion gelegt, so überraschte uns die überaus hohe Angehrate von 94,7 % bei der subcutanen und von 83,4 % bei der intraperitonealen Übertragung von Zellkernen.

Da die Viren innerhalb einer Zelle hauptsächlich in der stoffwechselaktiven Region des retikulären Apparates und in den Golgi-Bezirken zu finden sind und bei unseren elektronenmikroskopischen Aufnahmen auch hauptsächlich in der Ribosomenfraktion vorhanden waren, glaubten wir nicht so sehr daran, mittels der Zellkerne diese Tumoren transplantieren zu können.

Geht man weiterhin von einer unmittelbaren Beteiligung der Viren bei der Tumorentstehung aus, so müssen wir nach Gründen für diese hohe Angehrate suchen: Die erste Möglichkeit, eine größere ein- oder mehrmalige Verunreinigung durch ganze Tumorzellen können wir ausschließen. Dagegen sprechen sowohl die ständig gleich hohe Angehrate nach den verschiedenen, zeitlich hintereinander durchgeführten Präparationen als auch die laufenden Kontrollmaßnahmen. Wir überprüften jede Fraktion vor der Übertragung unter dem Phasenkontrastmikroskop auf Verunreinigungen.

Denkbar wäre, daß die Präparation der Zellkerne in der Art, wie sie von uns durchgeführt wurde, submikroskopische Verunreinigungen zuläßt, bzw., daß die an den Zellkernen haftenden Verunreinigungen durch Bestandteile des Zytoplasmas und vor allem der Golgi-Regionen Ursache für die Übertragung der Neubildungen sein könnten. Außerdem könnten in den Zellkernen versteckte, "maskierte" Viren vorhanden sein, die dann in den Wirtstieren den Tumor erzeugen. Dabei wäre zwar die virale Information in den Zellkern aufgenommen, das Virus als morphologische Identität jedoch nicht mehr sichtbar (71, 72).

6.5.2. Mitochondrien

Bei den Mitochondrienfraktionen erhielten wir ebenfalls einige positive Resultate. Jedoch war die Angehrate mit 23 % bei der subcutanen Übertragung deutlich niedriger. Die intraperitoneale Transplantation erbrachte keine Ergebnisse.

Wenn wir auch hier unsere obigen Überlegungen heranziehen, so müßte die Erfolgsquote bei den Transplantationsmaßnahmen gering sein, was sie in der Tat auch war. Die wenigen positiven Resultate könnten hier mit ziemlicher Sicherheit auf geringe Verunreinigungen der Mitochondrienfraktionen durch vereinzelte Partikelchen, wie auch die elektronenmikroskopischen Aufnahmen erkennen lassen, zurückzuführen sein.

6.5.3. Mikrosomen

Schon bei der Betrachtung der elektronenmikroskopischen Aufnahmen der Mitochondrien, insbesondere aber der Mikrosomenfraktionen, waren uns immer wieder einzelne dieser virusähnlichen Partikel aufgefallen. Solche Teilchen waren schon von mehreren Autoren (3, 19, 32, 61, 73, 79) bei Tiermelanomen als auch beim menschlichen Melanom beschrieben worden (10, 11).

Durch unsere Mikrosomenpräparation war es uns nun gelungen, eine geringe Anzahl dieser virusartigen Partikel anzureichern und wir hofften mit deren Übertragung einige Melanome zu erhalten. Die Ergebnisse waren durchaus ansprechend.

Bei den Mikrosomenübertragungen erkrankten 5 von 10 Versuchstieren, die sc beimpft worden waren und 4 von 15 Tieren, bei denen die Teilchen intraperitoneal injiziert wurden.

Daß die Übertragung nicht noch günstiger ausgefallen ist, mag folgende Gründe haben: In dem Versuchsmaterial, das wir für die Übertragung verwendeten, befanden sich eine zu große Anzahl von lytischen Fermenten oder aber es sind in dem Material nicht überwiegend reine Partikelchen vorhanden.

Die Hauptursache allerdings dürfte sein, daß die Materialmengen, die uns für diese Maßnahmen zur Verfügung standen, in ihrer Quantität nicht ausreichten, um in jedem Fall einen Tumor zu induzieren.

Die Annahme, daß es sich bei der Übertragung der Mikrosomen bzw. der virusähnlichen Partikelchen um einen Materialmangel handeln könnte, läßt sich durch folgende Überlegungen noch untermauern:

- a) Auf den elektronenmikroskopischen Aufnahmen sind nur wenige und vereinzelte Viren sichtbar.
- b) Vergleicht man die Umstände, bei den mit Mitochondrien und Mikrosomen geimpften erkrankten Tieren, wie Zeitdauer bis zum Auftreten eines Melanoms, das Tumorstadium und die Überlebenszeit der Tiere mit denjenigen der Tiere aus den Gruppen VI bis VIII des ersten Versuchsabschnittes, so erkennt man einige bemerkenswerte Parallelen:

In beiden Fällen waren nicht alle Übertragungen erfolgreich.

Erkrankten die Tiere schließlich doch, so betrug der Zeitraum zwischen Impftermin und Krankheitsausbruch:

	Erkrankungstag	Überlebenszeit
Gruppe VI, VIII:	14. - 19.	21-36 Tage
Mitochondrien:	9. - 24.	25-30 Tage
Mikrosomen:	12. - 20.	22-31 Tage

Wie bei den Zellübertragungen mit zunehmend geringerer Zellzahl die Ergebnisse immer unsicherer wurden und schließlich ausblieben, so lassen die Ergebnisse bei diesen Übertragungen den Schluß zu, daß die zur Überimpfung hergenommenen Materialmengen in eben diesem Grenzbereich liegen.

Immerhin erreichten wir bei der subcutanen Übertragung von Mikrosomen noch eine Angehrate von 50 %, bei der intra-peritonealen Übertragung eine Quote von 27,7 %.

6.5.4. Proteinmenge

Um die einzelnen Gruppen gegeneinander abwägen und die Ergebnisse besser deuten zu können, wählten wir die übertragene Proteinmenge als Basisgröße. Sie sollte uns die Möglichkeit zu vergleichenden Untersuchungen und zu sicheren Angaben geben. Es stellte sich jedoch heraus, daß dies nicht der Fall war; Setzt man nämlich die übertragene Menge an Protein in Beziehung zu den Ergebnissen, so ergibt sich kein klares Bild.

Wir erhalten z. B. bei den Mitochondrien bei einer Menge von 4,4 mg bei 2 Tieren einmal ein Ergebnis, bei 13 mg bei 4 Tieren nur einmal einen Tumor.

Ähnlich sind auch die Werte bei den Mikrosomen. Immerhin erkrankten hier bei einer Menge von 20,0 mg, die auf je 5 Tiere verbracht wurde, 4 Tiere, bei Mengen zwischen 11,0 und 15,6 mg erkrankten von 10 Tieren immerhin noch 4. Das Ergebnis bei den Zellkernen ist ebenfalls nicht eindeutig. Hier erkrankten sowohl bei 20 mg als auch bei 6,8 mg die Versuchstiere.

Warum wir im nachhinein die Proteinmenge als nicht geeignet für die Vergleichszwecke betrachten, hat folgenden Grund: Sollten die Tumoren wirklich durch eine Beteiligung der virusähnlichen Partikelchen induziert werden, so hat die Proteinmenge, die übertragen wird, höchstens eine indirekte Aussagekraft. So kann z. B. in einer relativ großen Mitochondrienmenge kein einziges dieser Partikelchen vorhanden sein, während ein anderes Mal in einer kleinen Menge verhältnismäßig viele virusähnliche Partikelchen enthalten sein könnten.

Damit sind aber auch Angaben über eine Proteinmenge wertlos. Sinnvoll wären sie nur dann, wenn in jeder Einheit dieselbe, vergleichbare Anzahl virusartiger Partikel enthalten wäre.

Als einziges glauben wir aus diesen Angaben ableiten zu können, daß die Mengen an Material, die für die einzelnen Übertragungsmaßnahmen zur Verfügung standen, insgesamt noch zu gering waren, um zu höheren Angehraten zu gelangen. Es sollten also Materialmengen von mehr als 20 mg Protein pro Tier übertragen werden. Vielleicht läßt sich dadurch eine höhere Angehrate erzielen.

Die von uns gefundenen Ergebnisse bieten keinen schlüssigen Beweis, daß bei der Übertragung des Hamstermelanoms A Mel 3 diese virusartigen Partikelchen eine Induktion dieses Tumors bewirken.

Wir konnten lediglich zeigen, daß eine Übertragung dieses Tumors mittels subzellulärer Strukturen möglich ist.

Inzwischen sind jedoch hierzu eindeutig positive Arbeiten publiziert worden (10, 12).

7.0. Z U S A M M E N F A S S U N G

Abschließend läßt sich zur Übertragung des Hamstermelanoms A Mel 3 folgendes sagen:

1. Die Übertragungsmaßnahmen sind einfach durchzuführen und bringen praktisch in jedem Falle einen Erfolg, wenn eine genügend hohe Anzahl von Tumorzellen pro Transplantation (es sollten mehr als 10^4 sein) zur Verfügung steht.
2. Die besten Wachstumsergebnisse für ein Melanom finden sich, wenn die Menge der übertragenen Zellen im Bereich von $0,5 - 1,5 \cdot 10^6$ liegt.
Hier zeigen Überlebenszeit der Tiere und Tumoranlage eine günstige Wechselbeziehung und führen zu einem ausgewogenen Wachstum.
3. Es besteht ein direkter Zusammenhang zwischen der Anzahl der übertragenen Melanomzellen und dem Tumorstadium, dem Erkrankungsstadium und der Überlebenszeit der Versuchstiere.
Je größer die Zellzahlen, desto rapider wächst der Tumor, desto früher erkranken und sterben die Tiere; je niedriger die Zellzahlen, desto später tritt ein Tumor auf, desto langsamer wächst er und desto länger überleben die Tiere.
4. Bei niedrigen Zellzahlen führen nicht mehr alle Übertragungsversuche zu einem positiven Ergebnis. Diese Art

Grenzbereich für eine sichere Übertragung liegt bei etwa 10^4 Zellen. Darunter ist nur noch ein immer kleiner werdender Prozentsatz von Transplantationen erfolgreich. Mit weniger als 1000 Zellen erhielten wir kein Ergebnis mehr. Ein absoluter Grenzwert, unterhalb dessen keine Transplantation mehr möglich ist, ließ sich nicht mit Sicherheit festlegen.

5. Der Tumor läßt sich wechselweise subcutan und intraperitoneal weiterführen, wobei es bei der intraperitonealen Übertragung zu einem Ascites der Versuchstiere kommt.
6. Überträgt man einen Tumor auf die Versuchstiere und behandelt sie gleichzeitig mit Proflavingaben von 10 - 24 mg/kg Körpergewicht und pro Tag, so steigt die Lebenserwartung der erkrankten Tiere deutlich an. Sie erreicht nahezu das Doppelte im Gegensatz zu den unbehandelten Tieren.
7. Das Hamstermelanom läßt sich auch zellfrei übertragen.
Die Übertragung gelang uns
 - a) durch den Überstand von Tumorzellen,
 - b) durch Zellkerne,
 - c) durch Mitochondrien,
 - d) durch Mikrosomen,
 wobei die Ergebnisse bei den Zellkernen und bei den Mikrosomen am günstigsten waren. In den Mikrosomenfraktionen fanden wir virusähnliche Partikelchen.

8.0. L I T E R A T U R

- 1 BALDA, B.-R., BIRKMAYER, G.D.
Der Einfluß von Proflavin auf den DNS-Stoffwechsel des Hamstermelanoms,
Arch. klin. exp. Derm. 239, 176-184 (1970)

- 2 - Nucleinsäure und Proteinsynthese des Hamstermelanoms unter dem Einfluß von Pharmaka
I. In vivo-Studien der DNS-Synthese in Hamstermelanomen,
Naunyn-Schmiedebergs Arch., Pharmak., Bd. 266, 291-292 (1970)

- 3 BALDA, B.-R., WOLFF, H.-H., BIRKMAYER, D.G., BRAUN-FALCO, O.
Virus-like particles in the hamster melanoma A Mel 3 of Fortner,
Naturwissenschaften 57, 548 (1970)

- 4 BALDA, B.-R. Zur Molekularbiologie des Hamstermelanoms A Mel 3, einem möglichen Modell für das menschliche Melanom,
Habil. Schr. Univ. München, 1971

- 5 BALDA, B.-R., BIRKMAYER, G.D.
Zur Hemmwirkung von Proflavin auf den Einbau von DNS-, RNS- und Proteinvorstufen in Hamstermelanomen,
Arch. Derm. Forsch. 243, 107-113 (1972)

- 6 BALDA, B.-R., BIRKMAYER, G.D., BRAUN-FALCO, O.
Particle-Associated RNA-Directed DNA Polymerase and 70 S RNA in the Hamster Melanoma A Mel 3,
Arch. Derm. Forsch. 248, 229-236 (1973)

- 7 BIRKMAYER, G.D., BALDA, B.-R.
Nucleinsäure und Proteinsynthese des Hamstermelanoms unter dem Einfluß von Pharmaka,
II. In vivo-Studien der Proteinsynthese in Hamstermelanomen unter der Behandlung mit Proflavin, Chloramphenicol und D-Penicillamin,
Naunyn-Schmiedeberg Arch. Pharmak., Bd. 266 294-296 (1970)

- 8 BIRKMAYER, G.D., BALDA, B.-R., BRAUN-FALCO, O.
Differences in Cytochrome Oxidase and Mitochondrial A T Pase in Melanotic and Amelanotic Melanoma,
Arch. Klin. exp. Derm. 239, 288-295 (1970)
- 9 - Evidence for proflavine sensitive proteins in malignant hamster melanomas,
Hoppe-Syler's Z. physiol. Chem. 352, 780-790 (1971)
- 10 BIRKMAYER, G.D.
Zell- und molekularbiologische Indizien für die Virusätiologie des Melanoms,
Habil. Schr. Univ. München, 1973
- 11 BIRKMAYER, G.D., BALDA, B.-R., MILLER, F., BRAUN-FALCO, O.
Virus-like particles in metastases of human malignant melanoma,
Naturwissenschaften 59, 369-370 (1972)
- 12 BIRKMAYER, G.D., BALDA, B.-R., MILLER, F.
The inhibitory effect of proflavine and ethidiumbromide on the cell free transmission and the growth of the hamster melanoma A Mel 3,
Europ. J. Cancer 9, 859-864 (1973)
- 13 BOHLAND, K. Trypoflavin, ein inneres Antiseptikum,
Med. Klin. 46, 1-8 (1919)
- 14 - Intravenöse Anwendung des Trypoflavins bei Infektionskrankheiten,
Dtsch. med. Wschr. 29, 1-12 (1919)
- 15 BOMIRSKI, A., DOMINICZAK, T., NOWINSKA, L.
Spontaneous transportable Melanoma in the golden hamster (mesocricetus auratus),
Acta Un. int. Cancer 18, 178-180 (1962)
- 16 BOMIRSKI, A., ZAWROCKA-WRZOLKOWA, T., PAUTSCH, P.
Electron Mikroskopische Studies on Transplantable Melanotic and Amelanotic Melanomas in Hamsters,
Arch. Derm. Forsch. 246, 284-298 (1973)

- 17 BRAUN-FALCO, O., CHRISTOPHERS, E.
 Melanomalignom, Feingewebliche Untersuchungen
 und Prognose,
 Vortrag auf einer Tagung der dtsh. Dermatologi-
 schen Gesellschaft Berlin, 29.9.-2.10.1971
- 18 CHAN, L.-M., VAN WINKLE, Q.
 Interaction of acriflavine with DNA and RNA,
 J. molec. Biol. 40, 490-495 (1969)
- 19 CHANNING, A. A., KASUGA, T., DEMOPOULOS, H. B.
 Virus particles in B-16 and S 91 mouse melanoma
 and their significance,
 Lab. Invest. 14, 219-230 (1965)
- 20 DELLA PORTA, G. D., RAPPAPORT, H., SAFTROTTI, U. and
 SHUBIK, P.
 Induction of melanotic Lesions during skin carcino-
 genesis in Hamsters,
 A. M. A. Arch. Path. 61, 305-313 (1956)
- 21 EHRLICH, P., LEPPMANN, A.
 Über die schmerzstillende Wirkung des Methylen-
 blau,
 Dtsch. med. Wschr. Leipzig XVI, 493 (1891)
- 22 EHRLICH, P., SHIGA, K.
 Farbentherapeutische Versuche bei Trypanosomen-
 erkrankung,
 Berl. klin. Wschr. XLI, 329-362 (1904)
- 23 EPSTEIN, W. L., FUKUYAMA, K., BENN, M., KESTON, A. S.,
 BRANDT, R. B.
 Transmission of a pigmented melanoma in golden
 hamsters by a cell-free ultrafiltrate,
 Nature London 219, 979-980 (1969)
- 24 FINKELSTEIN, Th., WEINSTEIN, I. B.
 Proflavine binding to t-RNA, synthetic RNA and
 DNA,
 J. biol. Chem. 242, 3763-3768 (1967)
- 25 FORTNER, J. G. Spontaneous Tumors including gastrointestinal neo-
 plasms and malignant melanomas in the Syrian
 Hamster,
 Cancer (Philad.) 10, 1153-1156 (1957)

- 26 FORTNER, J.G., ALLEN, A.G.
Hitherto Unreported Malignant Melanomas in the Syrian Hamster. An Experimental Counterpart of the Human Malignant Melanoma,
Cancer Res.18, 98-113 (1958)
- 27 -
Comparative Oncology of Melanomas in Hamsters and Man,
Pigment Cell Biology, 85-95, New York 1959
- 28 FORTNER, J.G., MAKY, A.G., SCHRODT, G.R.
Transplantable tumors of the Syrian (golden) hamster
Part I, Tumors of the alimentary tract, endocrine glands and melanomas,
Cancer Res. Suppl.10, 161-198 (1961)
- 29 FRIEND, C.
Cell free transmission in adult Swiss mice of a disease having the character of a leukemia,
J. exp. M.105, 307-318 (1957)
- 30 GERTLER, W.
Über die Behandlung von Melanomen,
Derm. Wschr.157, 2015-2021 (1965)
- 31 GRAFFI, A.
Viren als Krebsursache,
Spektrum 15, 308-313 (1969)
- 32 GRAFFI, J., BENDER, E., SCHRAMM, T., GRAFFI, A.
Viren vom C. Partikel-Typ in zellfrei erzeugten Hamstersarkomen,
Arch. f. Geschw. forsch.39, 281-291 (1972)
- 33 GREENE, H. S. N.
A spontaneous Melanoma in the Hamster with a Propensity for Amelanotic Alteration and Sarcomatous Transformation during Transplantation,
Cancer Res.18, 422-425 (1958)
- 34 GUTTMANN, P., EHRLICH, P.
Über die Wirkung des Methylenblau bei Malaria,
Berl. klin. Wschr. XXVIII, 453-956 (1891)
- 35 HARDING, H. E., PASSEY, R. D.
A transplantable melanoma of the mouse,
J. path. Bact.33, 417-427 (1930)

- 36 HOFMAN, W. . Therapeutische Probleme,
Dtsch. Gesundh. 19, 441-443 (1964)
- 37 HURWITZ, J. , FURTH, J.J. , MALAMY, M. , ALEXANDER, M.
The role of desoxyribonucleic acid in ribonucleic
acid synthesis.
III. The inhibition of the enzymatic synthesis of
ribonucleic acid and desoxyribonucleic acid by ac-
tinomycin D and proflavine,
Proc. nat. Acad. Sci. (Wash.) 48, 1222-1230 (1962)
- 38 ITO, R. , MISHIMA, J.
Particles in the cisternae of the endoplasmatic réti-
culum of Fortner's amelanotic and melanotic ma-
lignant melanomas,
J. invest. Derm. 48, 268-272 (1967).
- 39 KECK, A. , REDETZKY, H. , THIELE, H. , WINTER, K.
Biostatistische Methoden für den Arzt,
Berlin 1971
- 40 KEINING, E. , BRAUN-FALCO, O.
Dermatologie und Venerologie,
S. 678-681, Lehmann München 1961
- 41 KLUG, H. , THORMANN, Th.
Licht- und elektronenmikroskopische Untersuchun-
gen am malignen Melanom des Menschen und des
Goldhamsters,
Derm. Mschr. 155, 81-89. (1969)
- 42 KORTING, G. W.
Die Therapie des Melanoms,
Dtsch. Med. Wschr. 91, 501-505 (1971)
- 43 LERMAN, L. S. Structural considerations in the interactions of
DNA and acridines,
J. molec. Biol. 3, 18-20 (1961)
- 44 - The structure of DNA acridine complex,
Proc. nat. Acad. Sci. (Wash.) 49, 94-102 (1963)
- 45 LOWRY, O. H. , ROSEBROUGH, N. J. , FARR, A. L. , RANDALL, R. J.
Protein measurement with the Folinphenolreagent,
J. biol. Chem. 193, 265-273 (1951)

- 46 MANCINI, L.O., JASY, V., ANDERSON, J., YATES, V.J.
Morphology of tumors induced in Hamsters by Cellovirus, Tumor Tissue, and Tumorcells grown in culture,
Br. J. Cancer 26, 28-33 (1972)
- 47 MISGELD, V. Zur Immunologie des Melanomalignoms,
Hautarzt 24, 511-519 (1973)
- 48 NEUBERT, D. Vergleichende Untersuchungen über die Nucleinsäuresynthese in Zellkernen und Mitochondrien und ihre Beeinflußbarkeit durch Pharmaka,
Naunyn-Schmiedebergs Arch.exp. Path. Pharmak. 253, 152-175 (1965)
- 49 NEUBERT, D. Untersuchungen über den Nucleinsäurestoffwechsel in Zellkernen und Mitochondrien von Morris-Hepatomen.
In: H. Holzer und A.W. Holldorf (Ed.): Molekulare Biologie des malignen Wachstums,
S.69-73, Berlin-Heidelberg-New York, Springer 1966
- 50 OBERLING, C. Krebs, das Rätsel seiner Entstehung,
Hamburg 1959
- 51 OTT, F., STORCK, H.
Methode der quantitativen Transplantation beim Hamstermelanom in der Ascitesform,
Dermatologica 130, 325-331 (1965)
- 52 - Die spontanen malignen Melanome von Maus und Hamster mit besonderer Berücksichtigung der Ascitesform des Hamstermelanoms. A Mel 1,
Habil. Schr. Univ. Zürich, 1968
- 53 - Das Hamstermelanom M Mel 1 als Ascitestumor, I
I. Arch. klin. exp. Derm. 234, 362-383 (1969)
- 54 - Das Hamstermelanom M Mel 1 als Ascitestumor, II
Arch. klin. exp. Derm. 234, 384-398 (1969)

- 55 ORTH, G., JEANTEUR, Ph., CROISSANT, O.
Evidence for and Localization of Vegetative Viral
DNA Replication by Autoradiographic Detection of
RNA-DNA Hybrids in Sections of Tumors Induced
by Shope Papilloma Virus,
Proc. Nat. Acad. Sci. USA 68, 1876-1880 (1971)
- 56 POTTER, J. F., WIENEKE, K., GRIESEZ, J.
Role of neoplastic intravasation in the development
of hematogenous metastasis in amelanotic mela-
noma tumors 1 and 3,
Ann. Surg. 161, 400-405 (1965)
- 57 RAU, H. W. Therapie und Erfolgsaussicht beim Melanoblastom,
Langenbeck Arch. klin. Chir. 308, 543-547 (1964)
- 58 RAUSCHER, F. J.
Pathogenesis of a murine stem-cell leukemia in-
duced by a newly isolated virus,
Acta Un. Int. Cancer 19, 368-373 (1963)
- 59 RIVIERE, M. R., CHERMAN, B., CHOUROULINHOR, I., GUERIN, M.
Etude anatomopathologique et compotement biologique
d'un melanonome (M 62 222) greffable et metasta-
sant du hamster doré,
Bull. Ass. franc. Cancer 49, 94-172 (1962)
- 60 ROSENBERG, J. C., ASSIMACOUPOULOS, C., LOBER, P.,
ROSENBERG, S. A., ZIMMERMANN, B.
The malignant melanoma of Hamsters,
I. Pathologic Characteristics of a Transplanted
Melanotic and Amelanotic Tumor,
Cancer Res. 21, 627-631 (1961)
- 61 ROUS, P. Transmission of a malignant new growth by means
of a cell-free filtrate,
J. Am. M. Ass. LVI, 198 (1911)
- 62 SACHS, L. Statistische Methoden,
2. Aufl., Berlin-Heidelberg-New York, Springer
1973
- 63 SARMA, P. S., HUEBNER, R. J., LANE, W. T.
Induction of Tumors in Hamsters with an Avian
Adenovirus (CELO),
Science Ny. 149, 1108 (1965)

- 64 SCHROEDER, U.
Transplantationsversuche eines Spontantumors
beim Goldhamster,
Zbl. allg. Path. path. Anat. 102, 74-81 (1961)
- 65 SHNELL, G.D. Transplantable Tumors in Homburger and Fish-
man, The physic-pathology of cancer,
New York, 338-391 (1953)
- 66 SHUBIK, P., DELLA PORTA, G.R., PAPPAPORT, H., SPENCER, K.
A transplantable Induced Melanotic Tumor of the
Syrian golden Hamster,
Cancer Res. 16, 1031-1038 (1956)
- 67 SPJUT, H.J., VAN HOOSIER, G.L., TRENIN, J.J.
Neoplasms in Hamsters induced by Adenovirus
Type 12,
Archs. Path. 83, 199-206 (1967)
- 68 STÄUBLI, N., LOUSTALOT, P.
Electron Mikroskopy of Transplantable Melanotic
and Amelanotic Hamster Melanomas,
Cancer Res. 22, 84-88 (1962)
- 69 STENBACK, A.W., VAN HOOSIER, G.L., TRENIN, J.J.
Virusparticles in hamsters tumors as revealed by
electron mikroskopy,
Proc. Soc. Biol. N. Y. 122, 1219-1223 (1966)
- 70 STEWART, S.E., EDDY, B.E., STANTON, M.F.
Neoplasms in rodents induced by SE polyoma virus,
Acta Un. Int. Cancer 15, 842-851 (1959)
- 71 STEWART, S.E.
The polyoma virus,
Sci. Amer. 203, 63-71 (1960)
- 72 SÜSS, R., KINZEL, V., SCRIBNER, J.D.
Krebs-Experimente und Denkmodelle,
Springer Stuttgart, 1970
- 73 TAKAHASHI, M., MISHIMA, Y.
A Sequence of Virus-like Particle Formation in
the Ergoplasm of Greene's Malignant Melanoma
Cells,
Cancer 24, 904-911 (1969)

- 74 THIES, W., SCHEROWSKY, U.
Prognose des malignen Melanoms in Abhängigkeit vom Entstehungsmodus,
Arch. Derm. Forsch. 243, 210-214 (1972)
- 75 VAN DUUREN, B. L., SIVAK, A., KATZ, C., MELCHIONE, S.
Inhibition of tumor induction in twostage carcinogenesis on mouse skin,
Cancer Res. 29, 947-952 (1959)
- 76 WEINSTEIN, J. B., FINKELSTEIN, J. M.
Proflavine inhibition of protein Synthesis,
J. biol. chem. 242, 3757-3762 (1967)
- 77 WIDNELL, C. C., TATA, J. R.
A procedure for the isolation of enzymically active rat liver nucleic,
Biochem. J. 92, 313-317 (1964)
- 78 WOHLRAB, H., PEKER, J.
Über die Eignung von Transplantationsbedingungen des A Mel 3 Hamstermelanoms zur Beurteilung von Einflüssen auf das Tumorwachstum,
Dermatologica 143, 160-165 (1971)
- 79 WOLFF, H. H., BALDA, B. -R., BIRKMAYER, G. D., BRAUN-FALCO, O.
Zur Ultrastruktur des Hamstermelanoms A Mel 3,
Arch. Derm. Forsch. 240, 192-203 (1971)
- 80 ZABEL, R., KLUG, H., THORMANN, Th.
Strukturuntersuchungen an transplantablen Goldhamstermelanomen im Verlauf von mehreren Passagen,
Derm. Mschr. 157, 399-411 (1971)
- 81 ZABEL, R., THORMANN, Th., GUDAT, E.
Multiple primäre Melanome beim Rind,
Derm. Mschr. 156, 765-770 (1970)
- 82 ZILBER, L. A. Progress in experimental virology of cancer,
Progr. Exp. Res. 1, 1-66 (1960)

- 83 ZILBER, L. A. On the interaction between tumor virulenses and cells: a virogenetic concept of tumorigenesis, J. Nat. Cancer Inst. 26, 1311-1319 (1961)
- 84 ZOLLINGER, H. U.
Pathologische Anatomie, Bd. II,
2. Aufl., Stuttgart, Thieme 1969

Herrn Priv.-Doz. Dr. B.-R. Balda danke ich für die Überlassung des Themas und die Arbeitsmöglichkeit an der Dermatologischen Klinik der Universität München.

Mein Dank gilt auch Herrn Priv.-Doz. Dr. G. D. Birkmayer, der die elektronenmikroskopischen Aufnahmen für unsere Versuche anfertigte.

L E B E N S L A U F

Am 29.7.1947 wurde ich als Sohn der Eheleute Johann und Franziska Kimmerle, geb. Eyring, in Lauingen (Donau) geboren.

Von 1953 bis 1959 besuchte ich die Volksschule in Lauingen (Donau) und trat im September 1959 an das Musische Gymnasium Lauingen über, das ich im Juli 1967 mit dem Reifezeugnis verließ.

Für das Wintersemester 1967/68 wurde ich zum Studium der Zahnmedizin an der Ludwig-Maximilians-Universität München zugelassen. Nach vollständig bestandener Vorprüfung legte ich im Herbst 1972 das Staatsexamen in Zahnmedizin ab.

Vom Februar 1973 bis Mai 1974 leistete ich meinen Wehrdienst ab.

Seit 1.5.1974 bin ich in Landsberg am Lech als Assistent in einer Zahnarztpraxis tätig.

